

SKRINING BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL ENZIM SELULASE DARI SUMBER AIR PANAS PANGGO KABUPATEN SINJAI SULAWESI SELATAN



Skripsi

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih Gelar Sarjana Sains
Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar

Oleh
ZULFIANA LUTFI
NIM. 60300108012

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UIN ALAUDDIN MAKASSAR
2012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan penuh kesadaran, penyusun yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa skripsi ini benar adalah hasil karya penyusun sendiri. Jika di kemudian hari terbukti bahwa ia merupakan duplikat, tiruan, plagiat, atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya, maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

Makassar, 15 Agustus 2012

Penyusun,

Zulfiana Lutfi

NIM: 60300108012

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul, “Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Selulase dari Sumber Air Panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan”, yang disusun oleh Zulfiana Lutfi, NIM: 60300105010, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar, telah diuji dan dipertahankan dalam sidang *munaqasyah* yang diselenggarakan pada hari Senin, tanggal 27 Agustus 2012 M, bertepatan dengan 9 Syawal 1433 H, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana dalam Ilmu Sains dan Teknologi, Jurusan Biologi (dengan beberapa perbaikan).

Makassar, 27 Agustus 2012 M.
9 Syawal 1433 H.

DEWAN PENGUJI:

Ketua	: Dr. Muh. Khalifah Mustami, M. Pd (.....)
Sekretaris	: Wasilah, S.T., M.T. (.....)
Penguji I	: Dr. Muh. Khalifah Mustami, M. Pd (.....)
Penguji II	: Dr. Ir. Muh. Junda, M. Si (.....)
Penguji III	: Prof. Dr. Ahmad Abubakar, M. Ag (.....)
Pembimbing I	: Fatmawati Nur, S. Si., M. Si (.....)
Pembimbing II	: Hafsan, S. Si., M. Pd (.....)

Diketahui oleh:

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar,

Dr. Muh. Khalifah Mustami, M. Pd

NIP. 19710412 200003 1 001

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas Rahmat dan Karunia-Nya yang telah menganugerahkan kehidupan dan kemampuan sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **“Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Selulase dari Sumber Air Panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan”**. Tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi, di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. Penulisan tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Qadir Gassing selaku Rektor Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar beserta jajarannya.
2. Dr. Muh. Khalifah Mustami, M. Pd., Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar beserta jajarannya yang senantiasa memberikan bantuan dan arahan kepada penulis dalam penyelesaian studi ini.
3. Fatmawati Nur Khalik, S.Si., M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi dan dosen pembimbing I serta Hafsan, S. Si., M.Pd selaku Sekretaris Jurusan Biologi dan dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan, petunjuk serta dukungan hingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.
4. Kepala Laboratorium Biologi Fakultas Sains dan Teknologi yang telah memberikan fasilitas tempat bagi pelaksanaan penelitian penulis.
5. Segenap Dosen Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi yang telah mengajar, mendidik dan menyuguhkan banyak pengetahuan kepada penulis dari semester awal hingga dapat menyelesaikan studi di Universitas ini.
6. Terkhusus penulis ucapkan kepada kedua Orang tua tercinta Ayahanda Drs. Lutfi B., M. Kes. dan Ibunda Dra. Rosdiana yang senantiasa mendoakan, memberi kasih sayang, bantuan moril dan materil selama penulis menempuh pendidikan.
7. Kedua saudaraku Khaerunnisa dan Zulfahmi Lutfi atas dukungan, motivasi dan semangat pada penulis dalam mengerjakan tugas akhir ini.

8. Rekan seperjuanganku Syarifah Nurul Ulfah dan Andi Sumarni Nur atas kebersamaanya selama penelitian.
9. Seorang terdekat dan terkasih, A. Muammar Hasbi, S.H. yang telah setia menemani penulis dalam suka dan duka, dengan sabar memberikan perhatian, motivasi dan pengorbanan yang sangat berarti dalam penyusunan tugas akhir ini.
10. Teman-teman seangkatan 2008 (Ismi, Tika, Chia, Anti, Bhia, Takim dan Adi) atas semua persahabatan serta persaudaraan yang tetap terjalin sepanjang waktu dan kebersamaanya selama menempuh pendidikan.
11. Semua pihak yang telah membantu dan tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Tugas akhir ini tentunya masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi penyempurnaan tugas akhir ini. Akhir kata, penulis berharap agar tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Samata, 15 Agustus 2012

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
BAB I PENDAHULUAN	1-7
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian	7
D. Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8-40
A. Tinjauan Umum Enzim	8
B. Tinjauan Umum Selulase	19
1. Klasifikasi Selulase	20
2. Penggunaan Selulase	22
3. Aktivitas Selulase	26
4. Sumber Selulase	28
C. Isolasi dan Penapisan Selulase	31
D. Tinjauan Umum Bakteri Termofilik	33
E. Daerah Sumber Air Panas Panggo	37
BAB III METODE PENELITIAN	41-46

A. Jenis Penelitian	41
B. Variabel Penelitian	41
C. Definisi Operasional Variabel	41
D. Ruang Lingkup dan Batasan Penelitian	42
E. Alat Penelitian	42
F. Bahan Penelitian	43
G. Prosedur Kerja	43
H. Analisis Data	46
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	47-58
A. Hasil Penelitian	47
B. Pembahasan	50
BAB V PENUTUP	59-60
A. Kesimpulan	59
B. Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Beberapa Logam Sebagai Kofaktor	9
Tabel 2.2.	Beberapa Koenzim sebagai Kofaktor dan Senyawa yang dipindahkan	10
Tabel 2.3.	Klasifikasi Enzim Secara Internasional	10
Tabel 2.4.	Beberapa Enzim dengan pH Optimumnya	16
Tabel 2.5.	Metode yang digunakan untuk Menentukan Aktivitas Enzim Selulase	28
Tabel 2.6.	Mikroorganisme Penghasil Selulase	30
Tabel 4.1.	Kemampuan Aktivitas Selulolitik Bakteri Termofilik	48
Tabel 4.2.	Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Selulolitik	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Gambar Struktur Molekul Enzim	9
Gambar 2.2.	Hubungan Antara Aktivitas Enzim dengan pH	17
Gambar 2.3.	Pengaruh Konsentrasi Enzim Terhadap Kecepatan Reaksi atau Aktivitas Enzim	17
Gambar 2.4.	Mekanisme Pemotongan Rantai Selulosa	20
Gambar 2.5.	Klasifikasi Enzim Selulase	22
Gambar 4.1.	Hasil seleksi Bakteri pada Medium CMC setelah diInkubasi pada Suhu 60°C selama 24 jam	48
Gambar 4.2.	Hasil Pengamatan Mikroskopis Pengecatan Gram Dibawah Mikroskop	49

ABSTRAK

Nama Penyusun : Zulfiana Lutfi
Nim : 60300108012
Judul Skripsi : “Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Selulase
dari Sumber Air Panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi
Selatan”

Skrining bakteri termofilik penghasil enzim selulase dari sumber air panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi dari bulan Februari hingga Juni 2012.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri termofilik penghasil enzim selulase dan memperoleh karakterisasi isolat bakteri termofilik yang memiliki potensi selulolitik.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif.

Enam isolat menunjukkan aktivitas selulase dalam medium *Carboxymethylcellulose*. Tiga isolat dipilih untuk diuji berdasarkan diameter zona bening. B1 menunjukkan aktivitas hidrolitik relatif tinggi sebesar 2,83, yang diikuti oleh A1 sebesar 2,13 dan C1 sebesar 2,06. Karakter morfologi ketiga isolat memiliki bentuk bulat, tepi rata dan elevasi cembung. Permukaan koloni isolat A1 dan B1 halus mengkilap dan C1 kasar. Warna Isolat A1 dan B1 krem sedangkan C1 putih. Ketiga isolat merupakan bakteri Gram positif berbentuk basil dengan penataan monobasil dan diplobasil.

Kata Kunci : Selulase, sumber air panas, bakteri termofilik

ABSTRACT

Major Constituent : Zulfiana Lutfi
Nim : 60300108012
Title of Thesis : “*Screening of Thermophilic Bacteria Producing Cellulase Enzyme from Hot Spring Panggo of Sinjai District South Sulawesi*”

Screening of thermophilic bacteria cellulose from hot spring of Panggo of Sinjai District South Sulawesi has been done in Laboratory of Microbiology Faculty of Science and Technology from February to June 2012.

This study was aimed to obtain an thermophilic bacteria isolates that have producing cellulase enzyme and to characterize the thermophilic bacteria isolates that have potential cellulolytic.

This research is a descriptive research.

Six isolates showed cellulose activity in Carboxymethylcellulose. Three isolates were chosen for further study based on their clearing zone diameter. B1 showed relatively high hydrolytic activity by 2,83, followed by 2,13 and C1 by 2,06. Three isolates of morphological characters have a circular, margin flat and convex. Surface colony isolates A1 and B1 smooth and C1 rough. Colour isolates A1 dan B1 cream and C1 white. Three isolates are Bacteria Gram Positive basil colonies has characteristic such as monobacil and diplobacil.

Key words : Cellulase enzyme, Thermophilic bacteria, hot spring.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Enzim adalah suatu kelompok protein yang menjalankan dan mengatur perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi. Enzim merupakan biokatalisator yang mampu mempercepat reaksi biokimia yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel. Penggunaan enzim dalam mendegradasi polimer di bidang industri maupun pertanian telah banyak dilakukan untuk efisiensi biaya produksi. Salah satu enzim yang digunakan untuk mendegradasi polimer karbohidrat adalah enzim selulase.¹

Enzim selulase sangat diandalkan dalam bahan berserat selulosa dan banyak digunakan pada industri detergen, makanan ternak, tekstil, dan pabrik kertas. Berbagai aplikasi dari enzim selulase menjadikannya sangat potensial untuk diproduksi, terutama di Indonesia. Selulase dapat digunakan secara luas dalam industri tekstil, pulp dan kertas, deterjen, makanan, hingga pengolahan limbah. Pengembangan terbaru aplikasi selulase adalah pembuatan “biofuel” dengan bahan baku selulosa.²

¹ Damini Sumardjo, *Pengantar Kimia*, (Cet. I; Jakarta: EGC, 2008), h. 389.

² M. Z. Fanani, “**Eksplorasi Novel Gen Glikosida Hidrolase untuk Degradasi Biomassa: Pendekatan secara Metagenomik**” *Blog M.Z.Fanani*. <http://Eksplorasi-Gen-Glikosida-Hidrolase.wordpress.com> (16 Juli 2012).

Enzim untuk kebutuhan industri diekstraksi dari berbagai jenis sel makhluk hidup, tetapi pada saat ini enzim lebih banyak diekstraksi dari berbagai jenis mikroorganisme, sebab mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat dimanfaatkan manusia dalam jumlah dan jenis yang sangat bervariasi selain mikroorganismenya sendiri dapat dikulturkan untuk memperoleh enzim yang dihasilkannya.³ Bakteri sebagai salah satu mikroorganisme yang berperan sebagai penghasil enzim yang paling banyak digunakan dibanding tanaman dan hewan. Sebagai sumber enzim, bakteri dianggap lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang relatif murah, kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik dapat diatur serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim pada suhu tinggi.⁴

Pada tahun-tahun belakangan ini, enzim termostabil dari ekstrim termofilik menjadi sangat penting karena sifat termostabilitas intrinsik dan resistennya terhadap perubahan faktor-faktor fisik dan kimia.⁵ Bakteri termofilik menghasilkan enzim termostabil yang sangat penting dalam proses industri dan bioteknologi seperti dalam teknik-teknik biologi molekuler untuk kegunaan penelitian dan diagnostik.⁶ Bakteri termofilik dapat diisolasi dari berbagai sumber, termasuk sumber air panas baik yang

³ Palmer T., *Understanding Enzyme* (Ellishorwood publisher, 1985). 65.

⁴ Lestari. *Eksplorasi Enzim Termostabil dari Mikroorganisme Termofil* (Purwokerto: Fakultas Biologi, Univ. Jendral Sudirman, 2000), h. 21.

⁵ George, G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (New York, USA: Springer-verling, 2001). 239.

⁶ Vielle, C dan Zeikus, GJ. *Hyperthermophilic enzymmes: Sources, Uses and Molecular Mechanism, for Thermostability* (Microbiol Mol Biol Rev. 65, 2001), h. 43.

terdapat di darat maupun dilaut, tanah yang selalu terkena sinar matahari, bahan yang mengalami fermentasi seperti kompos dan instalasi air panas.⁷

Sumber enzim selulase dapat diperoleh dari berbagai jenis mikroorganisme. Sebagian besar enzim mikroorganisme untuk keperluan industri hanya berasal dari 11 jamur, 8 bakteri dan 4 ragi serta dalam prakteknya para produsen biasanya mencari enzim baru dari kelompok ini. Kebanyakan mikroorganisme yang digunakan dari jamur adalah *Aspergillus niger*, *Mucor sp.*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma viride*, *Penicillium vitale*, *Aerobacter aerogenes*, dll. Sedangkan dari bakteri adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, dll. Sumber enzim yang didapat dari ragi adalah *Saccharomyces cereviceae*, *Streptomyces phaeochromogens*, dll.⁸

Sebelumnya, Nurul Fitri Sari telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi strain bakteri penghasil selulase termostabil dari kawasan perairan Hydrothermal vent dan memperoleh 11 isolat bakteri positif selulase. Karakterisasi mikrobiologi dan biokimia menunjukkan bahwa strain terpilih merupakan genus *Geobacillus* dan tergolong bakteri gram negatif. Bakteri tersebut memiliki suhu tumbuh optimum pada 65°C.⁹ Penelitian ini, telah melakukan identifikasi bakteri termofilik yang mampu menghasilkan enzim selulase hingga ke tingkat genus, kekurangannya sampel penelitian diambil pada perairan saja tidak mengambil sedimen yang terdapat pada kawasan perairan hydrothermal vent.

⁷ Edward, C., *Thermophiles, Microbiology of Extreme Environments* (Alden Perss, Oxford, 1990), h. 125.

⁸ Soeprijanto dkk., *Biokonversi Selulose dari Limbah Tongkol Jagung Menjadi Glukosa Menggunakan Jamur Aspergillus Niger* (Surabaya: Fakultas Teknologi Industri, Institut teknologi Sepuluh Nopember, 2008), h. 6.

⁹ Nurul Fitri Sari, *Karakterisasi Bakteri Selulase Termofilik Asal Perairan Kawasan Hydrothermal Vent Kepulauan Kawio, Sulawesi Utara* (Bandung: Sekolah Ilmu Teknologi Hayati-ITB, 2012), h. 2.

Langkah pertama dalam pencarian enzim baru dari mikroorganisme adalah melakukan screening enzim. Screening merupakan upaya inventarisasi enzim yang dikelompokkan menurut fungsinya, misalnya enzim restriksi (endonuklease restriksi), ligase dan Taq DNA polymerase bermanfaat dalam pekerjaan laboratorium rekayasa genetika (genetic engineering).¹⁰

Pendekatan dengan mencari sumber-sumber enzim baru dari mikroorganisme termofilik yang diisolasi dari lingkungan unik merupakan langkah yang paling memungkinkan dilakukan, karena Indonesia memiliki banyak sumber air panas yang potensial dan unik.¹¹ Salah satu sumber air panas yang potensial untuk dieksplorasi mikroorganisme termofiliknya adalah sumber air panas Panggo. Berada di desa kaloling kec. Sinjai timur \pm 8 Km dari pusat kota. Kawasan air panas Panggo memiliki temperatur \pm 65°C. Objek wisata ini sangat potensial untuk dikembangkan, Karena selain memiliki areal pengembangan yang cukup luas (\pm 2 Ha) juga didukung dengan adanya aliran sungai besar yang airnya cukup jernih. Air panas Panggo muncul pada ketinggian 12 mdpl. Kawasan ini memiliki daya tarik berupa kolam permandian, keindahan panorama perbukitan dan hutan asli serta musik tradisonal.¹² Kondisi lingkungan yang belum tercemar memungkinkan sumber air panas Panggo menghasilkan bakteri lokal, khususnya bakteri penghasil enzim selulase yang dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri.

¹⁰ Sajidan, "Teknologi Rekombinan Enzim Fitase Dan Implementasinya Dalam Pembelajaran Mata Kuliah Biokimia, Genetika Dan Bioteknologi," *Blog Perpustakaan Universitas Sebelas Maret*. <http://UPT-Perpustakaan-universitas-sebelas-maret.pustakauns.ac.id>. (20 Oktober 2011).

¹¹ I Nyoman Tika, dkk. *Isolasi Enzim Lipase Termotabil Dari Bakteri Termofilik Isolat Air Panas Banyuwedang Kecamatan Gerogak, Buleleng Bali* (Bali: IKIP Negeri Singaraja, 2007), h. 109.

¹² Administrator, "Potensi Wisata Kabupaten Sinjai," *Situs Resmi Pemerintah Kabupaten Sinjai*. <http://www.sinjai.go.id/sinjai> (11 Oktober 2011).

Pemanfaatan sumber air panas yang tidak hanya sebagai obyek wisata juga sebagai habitat bagi mikroorganisme seperti bakteri termofilik yang memiliki potensi menghasilkan enzim selulase yang dapat dimanfaatkan dalam proses industri, relevan dengan yang dikemukakan dalam Al-Quran Surah Al-Qamar ayat 12 dijelaskan bahwa Allah Swt telah menciptakan sumber mata air dimuka bumi ini dengan banyak manfaat yang dapat digunakan bagi semua makhluk hidup ciptaan-Nya. Allah Swt berfirman:

وَفَجَّرْنَا الْأَرْضَ عُيُونًا فَالْتَقَى الْمَاءُ عَلَى أَمْرٍ قَدْ قُدِرَ ۚ

Terjemahnya : “Dan Kami jadikan bumi memancarkan mata air-mata air, maka bertemulah air-air itu untuk suatu urusan yang sungguh telah ditetapkan” (Q.S. Al-Qamar/54: 12).¹³

Ayat di atas memberi penjelasan kepada kita untuk senantiasa belajar dan mengembangkan ilmu pengetahuan kita agar dapat memanfaatkan sumber daya alam yang telah diciptakan oleh Allah Swt. Allah Swt. menciptakan segala sesuatu di bumi ini dengan maksud dan tujuan yang telah ditetapkanNya, tergantung dari kita hambaNya bagaimana dapat memanfaatkan sumber daya alam tersebut. Allah Swt. tidaklah menciptakan segala sesuatu tanpa tujuan. Termasuk mengenai sumber air panas yang tanpa kita sadari sangatlah bermanfaat dan memiliki potensi untuk dikembangkan dalam menghasilkan enzim selulase dari bakteri termofilik yang hidup dan berkembangbiak didalamnya. Ayat ini memberi kita motivasi untuk senantiasa

¹³ Departemen Agama R.I., *Al – Quran dan Terjemahannya*.

belajar dan mengembangkan pengetahuan kita tentang segala sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan disekitar kita.

Pemanfaatan sumber daya alam, termasuk sumber air panas relevan dengan Hadits Riwayat Bukhari dan Muslim, yaitu :

المثل ما يتم تعيين لي من الله من الهدى والعلم الأمر الأول هو مثل الأمطار الغزيرة التي تدفقت
علينا الأرض هناك بين الخصبة ويحمل الماء حتى تنمو النباتات والأعشاب المختلفة كثيرا هناك
أيضا المياه الانتظار ثم الله يضيف على الإنسان القدرة على استخدامه ثم يمكنهم شربها مع الماء
ري الحقول وزراعة المحاصيل وليس هناك شيء أسفل على مساحة الشقة التي لا تصمد، ولا
زراعة المحاصيل....(البخاري ومسلم)

Terjemahnya : *“Perumpamaan apa yang ditugaskan kepadaku oleh Allah untuk kusampaikan dari tuntunan dan pengetahuan adalah bagaikan hujan yang lebat yang tercurah ke bumi. Ada di antaranya yang subur, menampung air sehingga menumbuhkan aneka tumbuhan dan rerumputan yang banyak. Ada juga yang menampung air itu, lalu Allah menganugerahkan kepada manusia kemampuan untuk memanfaatkannya, maka mereka dengan air itu dapat minum, mengairi sawah dan menanam tumbuhan, dan ada lagi yang turun di daerah yang datar tidak dapat menampung air, tidak juga menumbuhkan tanaman....”* (HR Bukhari dan Muslim).¹⁴

Hadits di atas menjelaskan bahwa Allah telah menurunkan air dari langit, lalu ia terserap ke dalam bumi, kemudian Dia mengalirkannya ke bagian-bagian bumi

¹⁴ Administrator, “**Al-Quran Berbicara Tentang Air**” Blog Rumah Zakat. <http://www.rumahzakat.org>. (25 September 2012).

sesuai apa yang dikehendaki-Nya, dan ditumbuhkan-Nya mata air-mata air di antara yang kecil dan yang besar sesuai kebutuhan.

Berdasarkan hal di atas, maka dilakukanlah penelitian ini untuk mendapatkan isolat-isolat bakteri termofilik dari sumber air panas. Khususnya isolat-isolat bakteri termofilik yang dapat menghasilkan enzim selulase termostabil dari sumber air panas Panggo, Kabupaten Sinjai, Sulawesi Selatan.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat bakteri termofilik yang berpotensi untuk menghasilkan enzim selulase dari sumber air panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan?
2. Bagaimana karakteristik isolat bakteri termofilik yang memiliki potensi selulolitik dari sumber air panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan?

C. Tujuan Penelitian

- 1) Untuk mengetahui keberadaan isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Panggo, Kabupaten Sinjai, Sulawesi Selatan yang dapat menghasilkan enzim selulase.
- 2) Untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri termofilik yang memiliki potensi selulolitik dari sumber air panas Panggo Kabupaten Sinjai, Sulawesi Selatan.

D. Manfaat Penelitian

- 1) Untuk mendapatkan bakteri termofilik penghasil enzim selulase yang hidup di sumber air panas Panggo, Kabupaten Sinjai, Sulawesi Selatan.

- 2) Mengetahui karakteristik mikroorganisme yang memiliki potensi selulolitik dari sumber air panas Panggo, Kabupaten Sinjai, Sulawesi Selatan.
- 3) Sebagai sumber informasi untuk penelitian lebih lanjut terhadap usaha eksplorasi enzim selulase dari bakteri termofilik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Umum Enzim

Enzim merupakan larutan koloid atau katalis organik yang dihasilkan organisme. Enzim meningkatkan kecepatan reaksi yang dikatalisnya, artinya setiap enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim bersifat tetap.¹⁵ Enzim mampu mempercepat reaksi kimia paling sedikit 1 juta kali lebih cepat dari reaksi yang tidak dikatalis. Laju reaksi yang dikatalis enzim lebih cepat dari katalis lain. Dalam sintesis enzim, parameter lingkungan sangat mempengaruhi.¹⁶

Enzim adalah suatu katalisator protein yang dapat mempercepat reaksi kimia yang terjadi pada makhluk hidup dalam sistem biologi. Dalam mengkatalisis reaksi tersebut enzim bersifat sangat spesifik, sehingga meskipun jumlah enzim ribuan dalam sel dan substratpun sangat banyak tidak akan terjadi kekeliruan.¹⁷ Enzim merupakan protein khusus yang dapat bergabung dengan suatu substrat spesifik untuk mengkatalisis reaksi biokimia dari substrat tersebut.¹⁸ Dalam reaksi tersebut enzim

¹⁵ Jenni R., *ProGram Enzim Selulase-Hemiselulase pada Proses Drinking Kertas Koran Bekas* (Jurnal Matematika dan Sains, 2003), h. 67.

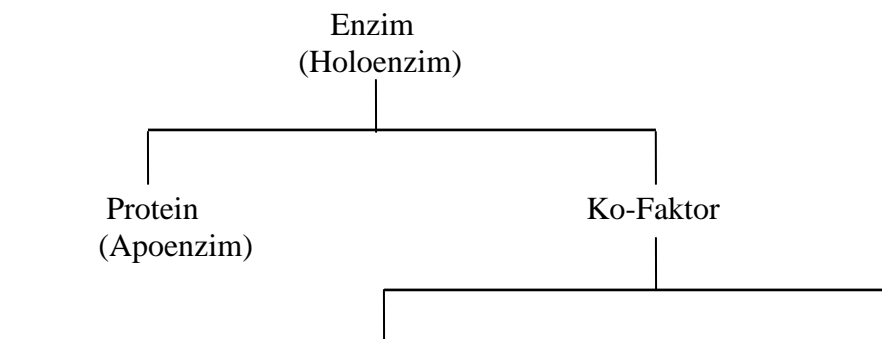
¹⁶ Darwis, A.A & Sunarti, T.C., *Teknologi Mikrobial* (Institut Pertanian Bogor, 1992), h. 56.

¹⁷ Shahib MN., *Pemahaman Seluk Beluk Biokimia dan Penerapan Enzim* (Citra Aditya Bakti, 1992), h. 72.

¹⁸ Maier, RM., Pepper IL & Gerba CP., *Environmental Microbiology* (London: Academic Press, 2000), h. 121.

mengubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk senyawa baru yang disebut produk. Enzim memiliki substrat spesifik dan reaksi kimia yang spesifik untuk dikatalisnya.¹⁹ Dalam jumlah yang kecil, enzim dapat mengatur reaksi tertentu sehingga dalam keadaan normal tidak terjadi penyimpangan hasil reaksi. Karena Enzim mengkatalisator reaksi-reaksi di dalam sistem biologis, maka enzim disebut sebagai biokatalisator.²⁰

Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi dan dengan demikian mempercepat proses reaksi. Percepatan terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Sebagian besar enzim bekerja secara khas, yang artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim yang bersifat tetap.²¹ Enzim yang strukturnya sempurna dan aktif mengkatalisis, bersama-sama dengan koenzim atau gugus logamnya disebut holoenzim. Secara ringkas struktur sebuah enzim yang aktif dapat dilihat pada Gambar 2.1.



¹⁹ Palmer T., *Understanding Enzyme* (Ellishorwood publisher, 1985), h. 152.

²⁰ Murray, RK., Granner, D.K., Rodwell, V.W., *Biokimia* (Jakarta: EGC, 2003), h. 70.

²¹ Aguskrisno, "Kajian Mikrobiologi Industri," *Blog Aguskrisno: Pondok Ilmu*. <http://Pondok-Ilmu-Kajian-Mikrobiologi-Industri.Wordpress.com> (15 Oktober 2011).

Molekul Organik
(koenzim)
Contoh : Vitamin, FAD

Molekul Anorganik
(ion logam)
Contoh : Fe^{+2} , Mn^{+2}

Gambar 2.1 Struktur Molekul Enzim²²

Kofaktor pada beberapa enzim dapat terikat secara lemah atau terikat secara kuat (permanent). Jika kofaktor terikat kuat dengan protein enzim dinamakan bagian prostetik. Beberapa jenis logam sebagai bagian kofaktor dapat dilihat pada Tabel 2.1. dan beberapa koenzim sebagai bagian kofaktor dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.1. Beberapa Logam sebagai Kofaktor²³

Logam	Nama Enzim
Fe^{+2} dan Fe^{+3}	Oksidase sitokrom, Katalase, Peroksidase
Cu^{+2}	Oksidase sitokrom
Zn^{+2}	Polymerase DNA, Anhidrase karbonik, Dehidrogenase alkohol.
Mg^{+2}	Heksokinase, 6-fosfatase glukosa
Mn^{+2}	Arginase
K^{+}	Kinase piruvat (juga memerlukan Mg^{+2})
Ni^{+2}	Urease
Mo	Reduktase nitrat
Se	Peroksidase glutasion

Tabel. 2.2 Beberapa Koenzim sebagai Kofaktor dan Senyawa yang dipindahkan²⁴

Koenzim	Senyawa yang dipindahkan
---------	--------------------------

²² Suhara, *loc. cit.*

²³ *Ibid.*

²⁴ *Ibid.*

1. Thiamin pirofosfat	Aldehida
2. Flavin adenin dinukleotida (FAD)	Atom hidrogen Ion hidrida (H ⁻)
3. Nikotinamida adenin dinukleotida (NAD)	Gugus asil
4. Koenzim A	Gugus amino
5. Piridoksal fosfat	Atom H dan gugus alkyl
7. Biositin	CO ₂
8. Tetrahidrofolat	Gugus satu-karbon lainnya

Banyak enzim yang telah dinamakan dengan menambahkan akhiran ase kepada nama substratnya, misalnya urease mengkatalisis hidrolisis urea, amilase menghidrolisis amilum. Tetapi banyak pula enzim yang dinamakan tidak berdasarkan nama substratnya, misalnya tripsin dan pepsin. Juga ada enzim yang dikenal dengan dua nama, misalnya amilase yang dihasilkan kelenjar ludah dinamakan pula ptialin. Karena itu, dan juga dengan terus meningkatnya jumlah enzim yang baru ditemukan, suatu dasar penggolongan enzim secara sistematis telah dikemukakan oleh persetujuan Internasional. Klasifikasi enzim secara Internasional dapat dilihat pada Tabel 2.3. Sistem klasifikasi ini menempatkan semua enzim ke dalam enam kelas utama, masing-masing dengan subkelas, berdasarkan atas jenis reaksi yang dikatalisisnya.

Tabel. 2.3. Klasifikasi Enzim Secara Internasional²⁵

No.	Nama Enzim	Tipe Reaksi yang Dikatalisis	Contoh
1	Oksidoreduktase	Transfer elektron	Alkohol dehidrogenase
2	Transferase	Transfer gugus fungsi	Heksokinase

²⁵ *Ibid.*

3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis	Tripsin
4	Liase	Pemutusan ikatan C-C, C-O, C-N, membentuk ikatan rangkap	Piruvat dekarboksilase
5	Isomerase	Pemindahan gugus di dalam molekul, membentuk isomer	Maleat Isomerase
6	Ligase (sintetase)	Pembentukan Ikatan	Piruvat karboksilase

Tiap-tiap enzim ditetapkan ke dalam empat tingkat nomor kelas dan diberikan suatu nama sistematis, yang mengidentifikasi reaksi yang dikatalisis. Contoh, enzim yang mengkatalisis reaksi:



Nama sistematis formal enzim ini adalah: *fosfotransferase ATP: glukosa*, yang menunjukkan bahwa enzim ini mengkatalisis pemindahan gugus fosfat dari ATP ke glukosa. Enzim ini ditempatkan ke dalam kelas 2 dan nomor klasifikasinya adalah 2.7.1.1, dengan bilangan pertama (yaitu 2) menunjukkan nama kelas (transferase), bilangan kedua (7) bagi subkelas (fosfotransferase) dan bilangan ketiga (1) bagi sub-sub kelas (fosfotransferase dengan gugus hidroksil sebagai penerima), dan bilangan keempat (1) bagi D-glukosa sebagai penerima gugus fosfat. Jika nama sistematisnya rumit, maka nama biasa dari enzim ini adalah heksokinase.²⁶

²⁶ *Ibid.*

Secara umum, enzim sering digunakan dalam proses produksi.²⁷ Pada abad ke-20 enzim telah dikembangkan sebagai komoditas yang diproduksi dan diperdagangkan di seluruh dunia.²⁸ Enzim memegang peranan penting dalam dunia industri seperti industri tekstil, deterjen, bahan pangan dan minuman, bahan kimia, obat-obatan, dan industri kulit.²⁹ Pada tahun 1996, Indonesia mengimpor enzim sebesar 2.490.396 kg dengan nilai US \$ 12.181.608.³⁰ Enzim yang digunakan pada umumnya berasal/diisolasi dari bakteri.³¹

Kemampuan enzim yang unik dalam melaksanakan transformasi kimianya yang khas ketika diisolasi telah meningkatkan penggunaan enzim dalam berbagai proses industri. Di bidang industri, enzim yang digunakan sebagian besar diisolasi dari mikroorganisme. Pemilihan mikroorganisme sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan yang diisolasi dari tanaman maupun dari hewan. Antara lain adalah sel mikroorganisme relatif lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki produksi yang lebih besar, biaya produksinya relatif rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek.³²

²⁷ Poernomo, *Kitinase Dalam Pengendalian Hayati* (Jakarta: Majalah Farmasi Airlangga, 2004), h. 24.

²⁸ Aguilar, A. *Extremophile Research in the European Union: From Fundamental Aspects to Industrial Expectations* (FEMS Microbiol, 1996), h. 89.

²⁹ Muchtadi S., Nurleni dan Made., *Enzim dalam Industri Pangan* (Bandung: Institut Pertanian Bogor, 1992), h. 27.

³⁰ Richana, M., *Perilaku Kultivasi Isolat Bakteri Termofil Penghasil α Amilase* (Mikrobiol Indonesia, 1999), h. 35.

³¹ Poernomo, *loc. cit.*

³² *Idem*, *Enzim Kitinase* (Jakarta: Majalah Farmasi Airlangga, 2003), h. 31.

Penggunaan enzim dalam proses produksi dapat meningkatkan efisiensi yang kemudian meningkatkan jumlah produksi. Bidang bioteknologi industri mengembangkan teknologi dan bioproses dengan segala ilmu pendukungnya, seperti mikrobiologi, rekayasa genetika, biokimia atau ilmu pendukung lainnya. Bioproses, yang didalamnya meliputi bidang produksi antara lain antibiotika, asam amino, pengendalian limbah, ataupun enzim.³³ Dalam proses biokimia yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel, enzim berfungsi sebagai katalis. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 – 10^{11} kali lebih cepat daripada reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis.³⁴

Enzim biasanya sangat spesifik terhadap reaksi yang ia kataliskan maupun terhadap substrat yang terlibat dalam reaksi. Bentuk, muatan dan karakteristik hidrofilik/hidrofobik enzim dan substrat bertanggung jawab terhadap kespesifikan ini. Enzim juga dapat menunjukkan tingkat stereospesifisitas, regioselektivitas, dan kemoselektivitas yang sangat tinggi.³⁵ Beberapa enzim yang menunjukkan akurasi dan kespesifikan tertinggi terlibat dalam pengkopian dan pengekspresian genom. Enzim-enzim ini memiliki mekanisme "sistem pengecekan ulang". Enzim seperti DNA polimerase mengatalisasi reaksi pada langkah pertama dan mengecek apakah produk reaksinya benar pada langkah kedua.³⁶

³³ Poernomo, *op. cit.*, h.26.

³⁴ Poedjadi A., *Dasar-dasar Biokimia* (Jakarta: Universitas Indonesia).h. 67.

³⁵ Jaeger KE, Eggert T.. "Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution". *Curr Opin Biotechnol.* 15 (4)((2004)): 305–13

³⁶ Shevelev IV, Hubscher U. "The 3' 5' exonucleases". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3 (5) (2002): h. 364–76.

Pemanfaatan enzim dalam bidang industri harus memperhatikan faktor penting yang sangat mempengaruhi efisiensi dan efektivitas dari enzim yang digunakan. Faktor yang mempengaruhi reaksi enzim antara lain konsentrasi enzim, suhu, pH, dan spesifitas enzim.³⁷ Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu pH, konsentrasi substrat dan enzim, suhu dan adanya aktivator atau inhibitor.³⁸

a. Pengaruh Suhu

Suhu berpengaruh besar terhadap aktivitas enzim. Semua enzim bekerja dalam rentang suhu tertentu pada tiap jenis organisme. Peningkatan suhu eksternal secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu kerusakan struktur protein enzim, terutama kerusakan pada ikatan ion dan ikatan hidrogennya. Hal ini menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalis oleh enzim tersebut. Denaturasi enzim diatas suhu optimum akan menyebabkan terjadinya kematian pada sel organisme, tetapi beberapa organisme mampu bertahan hidup dan tetap aktif pada suhu yang sangat tinggi, dimana organisme lain sudah tidak mampu lagi hidup seperti bakteri dan alga yang ditemukan pada sumber-sumber air panas di taman Nasional Yellow Stone Amerika, suhu optimum untuk hidupnya sebesar 70° C.³⁹

³⁷ Hartati KF, dkk., *Faktor-faktor yang Berpengaruh Terhadap Tahap Deproteinase Menggunakan Enzim Protease Dalam Pembuatan Kitin dari Cangkang Rajungan* (Biosains, 2002), h. 68

³⁸ Lehninger, A. L., *Dasar-dasar Biokimia* (Cet. I; Jakarta: Erlangga, 1998), h. 235.

³⁹ Brock Td & Brock KM., *Basic Microbiology With Application* (Cet. II; Prentice Hall, Inc, New Jersey, 1978), h. 583.

Oleh karena reaksi kimia itu dapat dipengaruhi oleh suhu, maka reaksi yang menggunakan katalis enzim yang dapat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Disamping itu, karena enzim itu adalah suatu protein maka kenaikan suhu dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi. Apabila terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif enzim akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan menurun. Kenaikan suhu sebelum terjadinya proses denaturasi dapat menaikkan kecepatan reaksi.⁴⁰

b. Pengaruh pH

Selain suhu, aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH lingkungan tempat enzim tersebut bekerja. Banyak enzim yang sensitif terhadap perubahan pH dan setiap enzim memiliki pH optimum untuk aktifitasnya. Perubahan pH dapat menyebabkan berhentinya aktivitas enzim akibat proses denaturasi pada struktur tiga dimensi enzim. Umumnya enzim bekerja optimum pada rentang pH 6-8, tetapi beberapa jenis organisme dapat hidup pada pH yang lebih rendah dengan istilah asidofil ataupun pada pH yang lebih tinggi yang dikenal dengan istilah alkalifil.⁴¹ Beberapa jenis enzim dengan pH optimumnya dari berbagai sumber dapat dilihat pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Beberapa Enzim dengan pH Optimumnya⁴²

Enzim	Sumber	Substrat	pH optimum
-------	--------	----------	------------

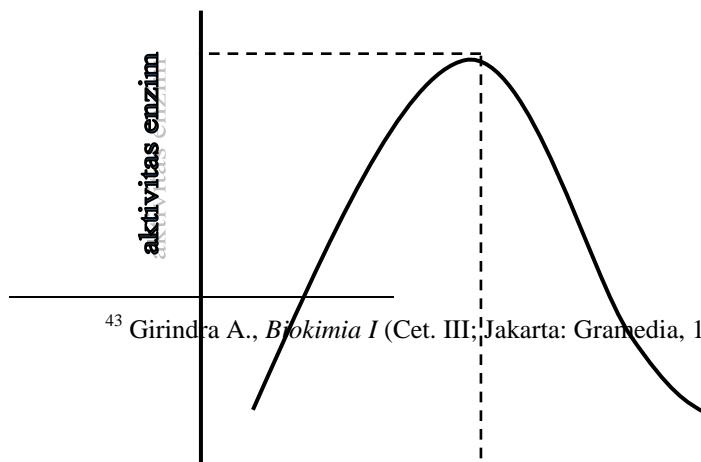
⁴⁰ Anna Poedjiadi dan F.M., Titin Supriyanti, *Dasar-dasar Biokimia* (Jakarta; Penerbit Universitas Indonesia, 1994), h. 161.

⁴¹ Palmer, *loc. cit.*

⁴² *Ibid.*

Sukrase	Usus halus	Sukrosa	6,2
Amilase	Saliva, pankreas	Amilum	5,6 – 7,2
Lipase	Pankreas	Etil butirat	7,0
Pepsin	Lambung	Albumin	1,5 – 2,5
Tripsin	Pankreas	Kasein	8 – 11

Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (*Zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Disamping pengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH rendah atau tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. pH berpengaruh karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus asam amino mudah dipengaruhi pH. Hal ini menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim jadi berubah. Perubahan pH juga menjadi penyebab denaturasi protein dan mengakibatkan hilangnya aktifitas enzim. Untuk mempelajari enzim, terlebih dahulu harus dicari pH optimum dengan menggunakan buffer yang sesuai.⁴³ Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 2.2.

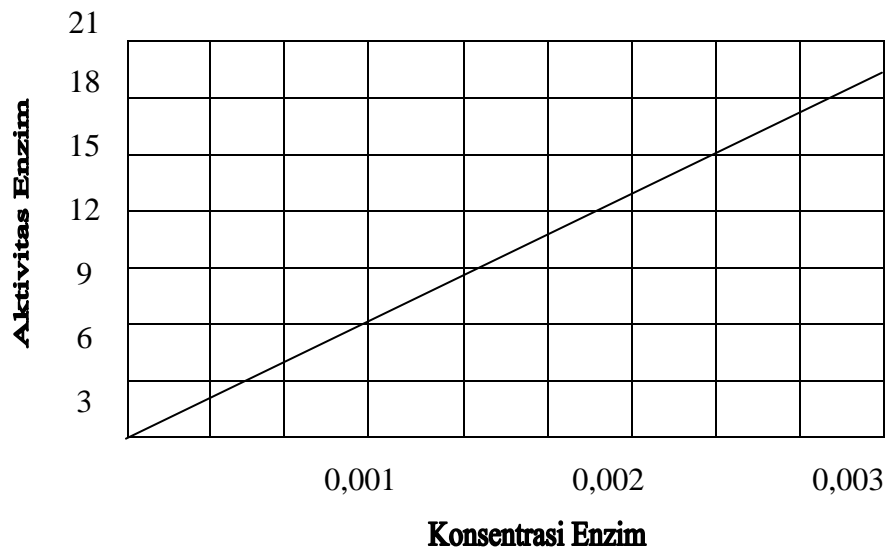


⁴³ Girindra A., *Biokimia I* (Cet. III; Jakarta: Gramedia, 1993), h. 100.



Gambar. 2.2 Hubungan Antara Aktivitas Enzim dengan pH⁴⁴

Seperti pada katalis lain, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Gambar 2.3. menunjukkan pengaruh konsentrasi enzim terhadap kecepatan atau aktivitas enzim.



Gambar. 2.2 Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Kecepatan Reaksi atau Aktivitas Enzim⁴⁵

c. Pengaruh Konsentrasi Enzim

⁴⁴ *Ibid.*

⁴⁵ *Ibid.*

Kecepatan enzim bereaksi dipengaruhi pada konsentrasi enzim yang berperan sebagai katalisator. Suatu reaksi yang dikatalis oleh enzim terlebih dahulu terbentuk kompleks enzim substrat (ES), yang kemudian terurai menjadi enzim dan produknya.⁴⁶ Aktivitas enzim sendiri diperbesar dengan adanya aktifator yang mengaktifkan enzim. Aktifator tersebut dapat berupa logam dan non logam yang merupakan zat-zat non spesifik yang menggiatkan proses enzimatis. Umumnya aktifator ini merupakan bahan yang tahan panas dan berberat molekul relatif rendah.⁴⁷

Aktivitas enzim di lingkungan juga terjadi pada berbagai sumber mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan aktinomisetes. Mikroorganisme ini menghasilkan enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang dilepas dari sel ke lingkungan untuk menghidrolisis molekul polimer di lingkungan, seperti selulosa, hemiselulosa, lignin, ataupun juga untuk memfasilitasi pengambilan suatu zat dari lingkungan bagi kebutuhan metabolismenya. Enzim ekstraseluler dapat dipisahkan dari lingkungan dengan filtrasi ataupun sentrifugasi, sedangkan enzim intraseluler dapat diekstrak dari dalam sel lewat proses pemecahan sel.⁴⁸

Enzim dapat diproduksi dengan proses fermentasi.⁴⁹ Fermentasi dapat dilakukan pada dua jenis medium yaitu medium cair dan medium semi padat atau padat. Keuntungan fermentasi pada medium cair adalah komposisi dan konsentrasi

⁴⁶ Girindra, *op. cit.*, h. 101.

⁴⁷ Baldwin, E., *Dynamic Aspects of Biochemistry* (Cambridge: University Press, 1973), h. 135.

⁴⁸ Maier, RM., Pepper IL & Gerba CP, *loc. cit.*

⁴⁹ Rachman, A., *Pengantar Teknologi Fermentasi* (Bogor: Depdikbud, Institut Pertanian Bogor, 1989), h. 17.

medium dapat diatur dengan mudah. Selain itu, oksigen, pH dan nutrisi dapat tersebar secara merata karena adanya proses agitasi.⁵⁰

B. Tinjauan Umum Enzim Selulase

Enzim selulase adalah enzim yang termasuk dalam kelompok enzim hidrolase yang mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan β -1,4 glukon dari senyawa selulosa, selodektrin, selubiosa dan turunan selulosa lainnya. Selulase merupakan nama umum trivial bagi enzim selulase, sedangkan nama sistematiknya adalah β -1,4 glukon-4-glukanohidrolase.⁵¹

Selulase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glukosida pada selulosa dan turunannya. Enzim ini dapat mengubah selulosa tak tersubstitusi menjadi selubiosa yang kemudian dihidrolisis lebih lanjut dengan β -glukosidase. Pemutusan ikatan ini akan menghasilkan oligosakarida turunan selulosa, untuk akhirnya diubah menjadi monomer glukosa. Selulase termasuk sistem multienzim yang terdiri dari endoglukanase (EC.3.2.1.4), selobiohidrolase (EC.3.2.1.91), dan β -glukosidase (EC.3.2.1.21). Semua komponen tersebut bekerja secara sinergis untuk mendegradasi selulosa. Selulase dihasilkan oleh mikroorganisme dan dapat diekstrak secara ekstraseluler pada jamur dan bakteri.⁵² Mikroorganisme selulolitik dari kelompok bakteri memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk produksi enzim menjadi lebih pendek. Selain itu, tingkat variasi

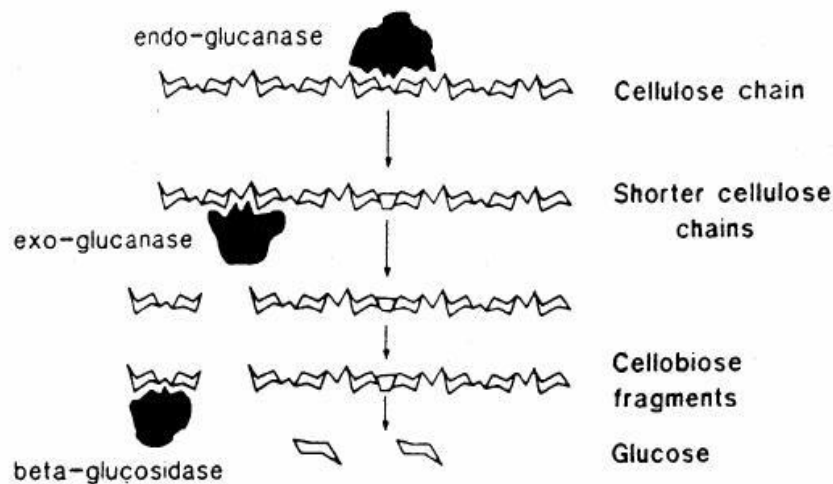
⁵⁰ Suhartono, M.T., *Enzim dan Bioteknologi* (Bogor: Depdikbud, Institut Pertanian Bogor, 1989), h. 166.

⁵¹ M. Wirahadikusumah, *Teknologi Enzim* (Bandung: Bioteknologi ITB, 1990). H. 37.

⁵² Athitya Diah Natalia Monica, *Studi Aktivitas Spesifik Selulase Dari Lactobacillus Collinoides Yang Dimurnikan Dengan Pengendapan Bertingkat Amonium Sulfat* (Malang: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, 2007), h. 6.

genetik kelompok bakteri sangat beragam sehingga memungkinkan dilakukan rekayasa genetika untuk optimasi produksi maupun aktivitas enzim selulasenya⁵³

Enzim selulase merupakan sistem enzim yang terdiri atas endo1,4 β glukukanase, ekso1,4 β glukukanase, dan β Dglukanase memotong ikatan rantai dalam selulosa menghasilkan molekul selulosa yang lebih pendek, ekso1,4 β glukukanase memotong ujung rantai selulosa menghasilkan molekul selobiosa, sedangkan β D glukukanase memotong molekul selobiosa menjadi dua molekul glukosa.⁵⁴ Mekanisme pemotongan rantai selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Mekanisme pemotongan rantai selulosa⁵⁵

⁵³ Alam, M. Z., Manchulur M. A., Anwar M. N. *Isolation Purification, Characterization of Cellulolytic Enzyme Produced by The Isolate Streptomyces omiyaensis* (Pakistan: J Biol Sci 7(10), 2004), h. 1647.

⁵⁴ Kim, H. *Characterization and Substrate Specivicity of an Endo Betha 1,4 DGlukanase (Avicelase I) from An Extracellular Multienzyme Complex of Bacillus Circulans* (Appl Environ Microbiol 61, 1995), h. 959.

⁵⁵ *Ibid.*

1. Klasifikasi Selulase

Enzim selulase adalah enzim yang mampu menghidrolisis selulosa menjadi gula sederhana atau glukosa. Nama sistematik enzim selulase adalah β -1,4 glukano-4-glukano hidrolase, dimana enzim selulase adalah nama umum untuk semua enzim yang dapat memutuskan ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selubiosa dan turunan selulosa lainnya.⁵⁶

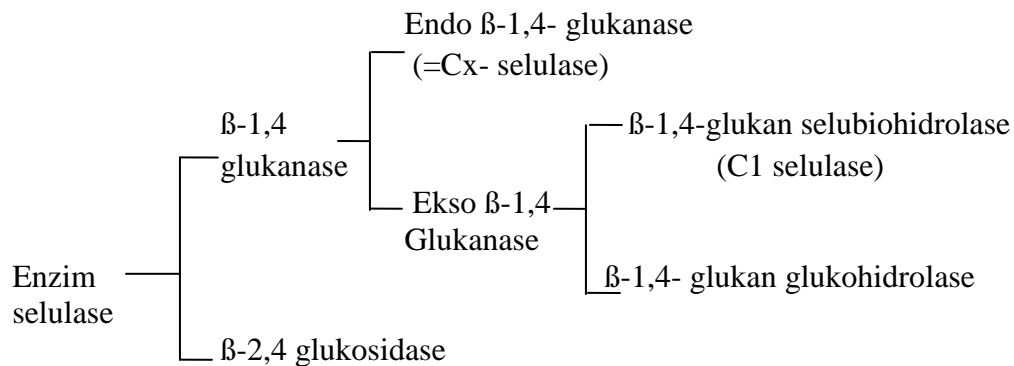
Terdapat 4 kelompok enzim utama yang menyusun selulase berdasarkan spesifitas substrat masing-masing, yaitu :

- a. Enzim endo- β -1,4 glukase, memiliki nama sistematik β -1,4-D-Glukano hidrolase (EC. 3.2.1.4). Enzim ini menghidrolisis ikatan glikosidik β -1,4 secara acak dan bekerja terutama pada daerah amorf dari serat selulosa, seperti pada *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC).
- b. Enzim β -1,4-D-Glukan Selobiohidrolase (EC.3.2.1.91), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa.
- c. Enzim β -1,4-D-Glukan Glukohidrolase (EC.3.2.1.74), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan D-glukosa.

⁵⁶ Kulp, K. *Carbohydrases. Dalam G.Reed (ed) Enzyme and food processing* (New York: Academic Press, 1975), h. 255.

- d. Enzim β -1,4-Glukosidase dengan nama sistematik β -1,4- Glukosida Glukohidrolase (EC.3.2.1.21), menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo-oligosakarida dan menghasilkan D-glukosa.⁵⁷

Klasifikasi enzim selulase menurut Prescott dan Dunns yaitu :



Gambar 2.5. Klasifikasi Enzim Selulase⁵⁸

2. Penggunaan Selulase

Selulase awalnya diteliti beberapa dekade yang lalu untuk keperluan biokonversibiomassa, yang membuka peluang untuk aplikasi industrial dalam berbagai bidang. Beberapa jenis industri yang memanfaatkan enzim selulase di

⁵⁷ *Ibid.* h. 7.

⁵⁸ Prescott. S. C. and C. G. Duns., *Industrial Microbiology* (AVI Pub Co. Inc. Eastport, Connecticut, 1981), h.

antaranya industri tekstil, makanan, deterjen, dan kertas. Menipisnya cadangan bahan bakar fosil yang dapat ditambang dengan teknologi masa kini mendorong pemanfaatan enzim selulase untuk biokonversi bahan lignoselulosa menjadi sumber energi.

1. Industri tekstil

Selulosa telah menjadi kelompok enzim terbesar ketiga yang dimanfaatkan dalam industri semenjak dikenal. Selulase merupakan enzim yang paling sukses digunakan dalam pemrosesan tekstil basah, terutama bagian proses akhir tekstil berbasis selulosa, dengan tujuan meningkatkan kualitas. Stonewashing jeans secara tradisional melibatkan pelepasan lapisan pati dengan bantuan amilase dan perlakuan abrasi dengan batu apung dalam mesin pencuci besar. Selulase umumnya digunakan untuk biostoning bahan jeans dan biopolishing kapas dan pabrik selulosa lainnya. Selama proses biostoning, selulase bekerja pada pabrik kapas dan memutuskan ujung fiber kecil pada permukaan tenunan, sehingga memudahkan pelepasan pewarna untuk menciptakan efek kabur atau luntur. Penggantian batu apung dengan selulase akan mengurangi kerusakan fiber, meningkatkan produktivitas mesin, dan lebih sedikit kerja intensif.⁵⁹

Selulase juga meningkatkan kelembutan dan sifat penyerapan air dari fiber, mengurangi kecenderungan pembentukan gumpalan, dan menghasilkan struktur permukaan yang lebih bersih dengan sedikit bulu halus. Penyiapan selulase yang kaya

⁵⁹ Antony Weng, "Produksi Enzim Selulase", *Blog Antony Weng*. <http://produksi-enzim-selulase.wordpress.com> (16 Juni 2012).

dengan endoglukanase paling cocok untuk biopolishing peningkatan tampilan, sentuhan, dan warna tanpa perlunya pelapisan dengan senyawa kimia lain. Aksi dari selulase dalam menghilangkan fiber kecil, bulu halus permukaan, menghasilkan tampilan yang licin dan mengkilap, serta meningkatkan kecerahan warna, hidrofilisitas dan absorbansi kelembapan, dan proses yang lebih ramah lingkungan.⁶⁰

2. Industri deterjen

Dibandingkan dengan enzim hidrolase lainnya di dalam deterjen, selulase tergolong unik. Jika enzim hidrolase lain seperti amilase dan lipase umumnya menyerang substrat yang terdapat pada kotoran atau noda, enzim selulase menghidrolisis selulosa pada kapas atau paduannya untuk memberi keuntungan dalam pencucian dan perawatan bahan. Aplikasi komersial enzim selulase dalam deterjen bermula pada tahun 1987, ketika produk deterjen Kao, Attack® menggunakan selulase alkalin dari *Bacillus sp.* Sejak 1991, sejumlah deterjen Eropa dan Amerika Utara juga melibatkan selulase. Selulase di dalam deterjen dapat membantu menjaga bahan kapas dan paduannya terlihat baru lebih lama dengan menghilangkan bulu halus yang terbentuk selama pemakaian. Dengan melepaskan fibril pada permukaan bahan, kotoran juga akan terlepas, sehingga selulase di sisi lain dapat memberikan efek pembersihan.⁶¹

3. Industri makanan dan minuman

⁶⁰ Kuhad, R.C., Gupta, R., dan Singh, A. *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications*. (Pakistan : Review Article of Enzyme Research, 2011), h. 10.

⁶¹ Flickinger, M.C. dan Stephen W.D. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation* (New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999), h.964.

Selulase juga memiliki potensi yang besar dalam aplikasi bioteknologi makanan. Produksi jus buah dan sayur memerlukan pengembangan metode ekstraksi, klarifikasi, dan stabilisasi. Selulase memiliki aplikasi penting bersama-sama dengan xilanase dan pektinase yang digunakan dalam ekstraksi dan klarifikasi jus buah dan sayuran untuk meningkatkan perolehan jus. Penggunaan enzim tersebut meningkatkan stabilitas dan tekstur cairan dan mengurangi viskositas sari buah tropis seperti mangga, pepaya, prem, dan pir. Tekstur, rasa, dan aroma dari buah dan sayur dapat ditingkatkan dengan mengurangi rasa pahit berlebih dengan infusi enzim pektinase dan β -glukosidase. Dalam produksi wine, enzim seperti pektinase, glukonase, dan hemiselulase berperan penting dengan meningkatkan ekstraksi warna, klarifikasi lapuk, filtrasi, dan terakhir stabilitas dan kualitas wine. Pembuatan bir berdasarkan pada aktivitas enzim selama fermentasi. Endoglukanase dan eksoglukanase dari selulase *Trichoderma* berperan dalam reduksi maksimum dari derajat polimerisasi dan viskositas.⁶²

4. Industri kertas dan pulp

Aplikasi selulase dalam industri pulp dan kertas telah meningkat selama dekade terakhir. Proses pulping mekanik dengan menggunakan selulase dapat menghemat energi 20-40% selama refining dan meningkatkan kekuatan lembaran. Endoglukanase juga dapat mengurangi viskositas pulp dengan menurunkan derajat

⁶² Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., dan Pandey, A. 2005. *Microbial Cellulases- Production, Applications, and Challenges* (Journal of Scientific & Industrial Research Vol 65, November 2005), h. 832.

hidrolisis. Selulase sendiri atau campurannya dengan xilanase dapat digunakan untuk proses deinking berbagai jenis limbah kertas. Aplikasi yang ada sekarang kebanyakan menggunakan selulase dan hemiselulase untuk melepaskan tinta dari permukaan fiber dengan hidrolisis parsial molekul karbohidrat. Keuntungan penggunaan enzim untuk proses deinking adalah mengurangi penggunaan alkali, meningkatkan kecerahan fiber, mempertahankan kekuatan kertas, dan mengurangi partikel-partikel halus dalam pulp. Akan tetapi penggunaan enzim untuk proses deinking tidak boleh berlebihan karena dapat mengurangi ikatan antar fiber.⁶³

5. Biofuel

Penggunaan selulase untuk menghasilkan biofuel merupakan bidang yang paling populer dikembangkan saat ini terkait aplikasi selulase. Bahan lignoselulosa (selulosa, hemiselulosa, dan lignin) sangat berlimpah sehingga berpotensi besar menjadi sumber bioenergi yang murah. Mikroorganisme dengan sistem selulase yang berpotensi untuk mengubah biomassa menjadi alkohol secara langsung telah ditemukan. Akan tetapi, proses produksi komersial masih memerlukan biaya tinggi sehingga tidak dapat berkompetisi dengan produk dari bahan baku lain. Beberapa faktor dalam proses mengurangi produktivitas biofuel di antaranya inhibisi produk terhadap enzim selulase, deaktivasi termal, ikatan nonspesifik pada lignin, dan adsorpsi irreversibel enzim pada substrat yang heterogen.⁶⁴

⁶³ Kuhad. *loc. cit.*

⁶⁴ *Ibid.*

Pengembangan lebih lanjut terkait teknologi pengubahan biomassa lignoselulosa menjadi biofuel perlu dilakukan. Saat ini, proses yang mungkin dilakukan adalah produksi bioetanol dari bahan lignoselulosa secara multistap. Pre-treatment terhadap bahan baku perlu dilakukan untuk mengurangi/menghilangkan kandungan lignin dan hemiselulosa. Selanjutnya selulosa dihidrolisis menjadi glukosa dan gula lainnya dengan selulase. Kemudian proses produksi bioetanol dilakukan dengan fermentasi menggunakan glukosa dan gula hasil hidrolisis tersebut. Untuk menekan biaya produksi enzim selulase, dapat dilakukan on-site production, karena penggunaan enzim murni sangat tidak ekonomis.⁶⁵

3. Aktivitas selulase

Pengukuran terhadap aktivitas enzim selulase umumnya dilakukan oleh para peneliti yang terlibat dalam penelitian mengenai produksi enzim oleh mikroorganisme yang tumbuh pada substrat selulosa atau limbah lignoselulosa. Semua enzim selulolitik dapat memutus ikatan β -1,4 glukosida, perbedaan dari masing-masing enzim terletak pada kespesifikan struktur di sekeliling substrat. Perbedaan kespesifikan dari enzim endoglukanase dan selubiohidrolase bersifat tidak mutlak karena keduanya dapat menghidrolisis ikatan β -1,4 glukosida dari selulosa amorf. Penentuan aktivitas enzim selulase akan sulit apabila filtrate yang akan diukur aktivitas enzimnya merupakan campuran dari berbagai enzim selulolitik. Enzim-enzim ini hanya dapat menghidrolisis substrat yang sama tetapi juga bekerja secara

⁶⁵ Sukumaran, *loc. cit.*

sinergistik memecah substrat yang sama, menyebabkan aktivitas yang diukur dipengaruhi oleh proporsi dari masing-masing enzim yang ada.⁶⁶

Suhu optimum bagi aktivitas enzim selulase umumnya berkisar antara 50-60°

C. Nilai pH optimum suatu enzim ditandai dengan menurunnya aktivitas pada kedua sisi lainnya dari kurva yang disebabkan oleh turunnya afinitas atau stabilitas enzim. Pengaruh pH pada aktivitas enzim disebabkan oleh terjadinya perubahan tingkat ionisasi pada enzim atau substrat sebagai akibat perubahan pH.⁶⁷ Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim dapat dilihat pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5. Metode yang digunakan untuk menentukan aktivitas enzim selulase⁶⁸

Aktivitas Enzim yang diukur	Substrat	Produk yang diukur
Total selulase	Selulosa kristalin : -kapas	-gula reduksi

⁶⁶ Enari, T.M., *Microbial Cellulases* (New York: Microbial Enzymes and Biotechnology. App.Sci. Publ., 1983). H. 102.

⁶⁷ Mandels, M. R., Anderotti dan C. Roche. *Measurement of Saccharifying Cellulose* (Biotechnol. Bioeng.Symp, 1976), h. 21.

⁶⁸ *Ibid.*

Endoglukanase β -glukosidase	-avicel	-glukosa
	-kertas saring	-gula reduksi
	-CMC dan HBC	-penurunan viskositas
	-selubiosa	-glukosa
	-salisin	-saligenin
	-PNPG	-p-nitrofenol

4. Sumber Selulase

Enzim dapat diproduksi dengan cara mengekstraksi dari tanaman, hewan dan mikroorganisme. Memproduksi enzim dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena mudah dikontrol pertumbuhannya. Mikroorganisme penghasil enzim selulase adalah kapang dan bakteri. Kapang merupakan penghasil enzim selulase dan ligninase yang paling sering diteliti. Kapang yang baik untuk memproduksi enzim selulase adalah *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *T. koningii*, *A. terreus*, *A. niger*, *Penicillium verruculosum*, *P. fusiculosum*, *Fusarium sola* dan *Phanerochaeta chrysosporium*.⁶⁹

Beberapa bakteri yang dianggap baik digunakan untuk menghasilkan enzim selulase adalah *Pseudomonas flurescent var cellulose*, *Cellumonas*, *Bacillus* dan *Clostridium thermocelum*, serta beberapa spesies *Actinomycetes* seperti *Thermonospor sp.* dan *Thermoctinomyces sp.*⁷⁰

⁶⁹ *Ibid.*

⁷⁰ Aunstrup, K. *Production isolation and economic of extracellular enzymes* (New York: Applied biochemistry bioengginering enzymes technology, Academic Press, 1979), h. 256.

Mikroorganisme penghasil selulase umumnya merupakan pengurai karbohidrat dan tidak dapat memanfaatkan protein atau lipid sebagai sumber energi. Mikroorganisme penghasil selulase terutama bakteri *Cellulomonas* dan *Cytophaga* serta kebanyakan fungi dapat mengutilisasi berbagai jenis karbohidrat lainnya selain selulosa, sedangkan spesies mikroorganisme selulolitik anaerobik terbatas pada selulosa dan/atau produk hidrolisisnya. Tidak semua mikroorganisme yang dapat mengutilisasi selulosa sebagai sumber energi menghasilkan kompleks enzim selulase yang lengkap. Hanya beberapa strain yang dapat menghasilkan kompleks enzim selulase yang terdiri dari tiga komponen utama yaitu endo- β -glukanase, ekso- β -glukanase, dan β -glukosidase. *T. Reesei* merupakan salah satunya dengan kemampuan menghasilkan enzim selulase dalam jumlah besar. Mikroba yang digunakan secara komersial untuk produksi enzim selulase umumnya terbatas pada *T. reesei*, *H. insolens*, *A. niger*, *Thermomonospora fusca*, dan *Bacillus sp.*⁷¹

Beberapa kelompok mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase dapat dilihat pada Tabel 2.6.

Tabel 2.6. Mikroorganisme Penghasil Selulase⁷²

Kelompok	Mikroorganisme	
	Genus	Spesies

⁷¹ Sukumaran, *loc. cit.*

⁷² *Ibid.*

Fungi	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>
		<i>A. nidulans</i>
		<i>A. oryzae</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>
		<i>F. oxysporum</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i>
		<i>H. grisea</i>
	<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i>
		<i>P. occitanis</i>
		<i>P. decumbans</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesei</i>
		<i>T. longibrachiatum</i>
		<i>T. harzianum</i>
Bacteria	<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulolyticus</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C. acetobutylicum</i>
		<i>C. acetobutylicum</i>
		<i>C. thremocellum</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulose</i>
	<i>Rhodothermas</i>	<i>R. marinus</i>
Actinomycetes	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. fimi</i>
		<i>C. bioazotea</i>
		<i>C. uda</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>S. drozdowiczii</i>
		<i>Streptomyces sp.</i>
		<i>S. lividans</i>
	<i>Thermomonospora</i>	<i>T. fusca</i>
		<i>T. curvata</i>

C. Isolasi dan Penapisan Selulase (Screening)

Strategi untuk memperoleh mikroorganisme yang sesuai dalam industri adalah memperolehnya dari lingkungan. Lingkungan yang paling umum adalah dari tempat produksi atau pada produk yang dihasilkan meskipun dapat pula diperoleh dari lingkungan lain seperti tanah, air dan sebagainya. Namun, umumnya isolate selalu diperoleh dari lingkungan yang mendekati atau pada substrat tempat tumbuhnya. Setelah sampel diperoleh maka problem yang sering dilakukan adalah mematikan atau menghambat kontaminan yang sering ada. Kultur diperkaya sering dipergunakan untuk memacu pertumbuhan organism yang diharapkan sehingga dapat diisolasi. Isolat yang diperoleh kemudian dimurnikan dan ditumbuhkan pada media padat. Sebagai kultur sediaan digunakan media agar miring. Isolat yang diperoleh harus diuji terlebih dahulu terhadap kemampuan membuat produk yang diharapkan, senyawa-senyawa penghambat dan pemacu pertumbuhannya, kondisi lingkungan yang diharapkan untuk tumbuh dan berproduksi secara optimum dan sebagainya.⁷³

Prosedur isolasi dan seleksi ini lebih mudah dilakukan untuk proses dengan kultur tunggal dan umumnya dilakukan pada lembaga-lembaga penelitian dan perguruan tinggi. Tahap pertama dalam penapihan mikroorganisme yang potensial untuk diterapkan dalam industry adalah isolasi.⁷⁴

Penelitian isolasi bakteri termofilik yang menghasilkan enzim selulase termostabil dilakukan oleh Neldia (2010) yang berhasil memperoleh isolat C2cII RP dari titik 2 meter pusat semburan. Aktivitas maksimum enzim selulase ini diperoleh

⁷³ Nurhidayat, dkk., *op. cit.* h. 27.

⁷⁴ Annisa, Y. *Studi Penentuan Aktivitas Enzim Lipase dari Bakteri Proteus vulgaris Galur local PP-I dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis dan metode Titrimetri* (BandarLampung: FMIPA Universitas Lampung, 2006), h. 22.

saat lama fermentasi 4 jam dan lama inkubasi 45 menit pada substrat CMC 2,5%.⁷⁵ Kekurangannya, penelitian ini tidak melakukan identifikasi terhadap jenis isolat yang diperoleh.

Langkah pertama dalam pencarian enzim baru dari mikroorganisme adalah melakukan screening enzim. Screening merupakan upaya inventarisasi enzim yang dikelompokkan menurut fungsinya, misalnya enzim restriksi (endonuklease restriksi), ligase dan Taq DNA polymerase bermanfaat dalam pekerjaan laboratorium rekayasa genetika (*genetic engineering*).⁷⁶

Penapisan (*Screening*) bertujuan untuk mengetahui apakah suatu mikroorganisme tertentu menghasilkan senyawa kimia tertentu seperti enzim. Penapisan dilakukan dengan cara menumbuhkan mikroorganisme pada medium selektif. Medium selektif mengandung substrat yang sesuai dengan enzim tertentu yang diinginkan. Penapisan dapat juga dilakukan dengan penambahan indikator warna pada medium. Warna indikator berubah jika mikroorganisme tersebut menghasilkan suatu enzim tertentu. Skrining selulase dilakukan pada media agar CMC (Carboxy Methyl Cellulose) menggunakan pewarnaan congo red dan pengujian aktivitas enzim menggunakan metode DNS (asam dinitrosalisilat).⁷⁷

⁷⁵ Masanori Sari Ariningsih, "Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik Dan Penentuan Kondisi Optimum Enzim Selulase Isolat C2cii Rp," Repository Universitas Andalas. <http://repository.unand.ac.id> (16 Juli 2012).

⁷⁶ Sajidan, "Teknologi Rekombinan Enzim Fitase Dan Implementasinya Dalam Pembelajaran Mata Kuliah Biokimia, Genetika Dan Bioteknologi," *Blog Perpustakaan Universitas Sebelas Maret*. <http://UPT-Perpustakaan-universitas-sebelas-maret.pustakauns.ac.id>. (20 Oktober 2011).

⁷⁷ Rachman A., *op.cit.*, h. 82.

D. Tinjauan Umum Bakteri Termofilik

Bakteri Termofilik adalah bakteri yang tumbuh dengan baik pada suhu diatas 45° C.⁷⁸ Bakteri termofilik tumbuh optimal pada suhu 45°C - 80°C, bahkan ada yang mampu hidup pada suhu 100°C atau lebih.⁷⁹ Bakteri termofilik dapat diisolasi dari lingkungan industri yang panas dan daerah pembangkit listrik,⁸⁰ sumber air panas, tumbuhan yang membusuk, tanah dan laut yang terpapar matahari.⁸¹

Bakteri termofilik menghasilkan enzim termostabil yang sangat penting dalam proses industri dan bioteknologi seperti teknik-teknik biologi molekuler untuk kegunaan penelitian dan diagnostik (enzim yang memproses DNA dan RNA) dan kemampuan enzim untuk mengubah tepung, makanan, pengelolaan sampah, pembuatan kertas dan sintesis zat-zat organik.⁸² Ketahanan bakteri terhadap suhu tinggi disebabkan oleh adanya enzim-enzim dan protein yang tahan terhadap panas. Selain itu, pada bagian membran sel bakteri tersebut terdapat asam-asam lemak jenuh

⁷⁸ Bauman, R.W., *Microbiology* (Toronto : Benjamins Cummings, 2004), h. 335.

⁷⁹ Lestari P., *Eksplorasi Enzim Termostabil dari Mikro Termofil* (Jurnal Hayati Vol.:7, 2000), h. 21.

⁸⁰ Brock, T.D., M.T. Madigan., J.M., Martinko & J. Parker, *Biology of Microorganism* (New Jersey : Prentice Hall, Inc., 1994),h. 153.

⁸¹ Collins, T.C., Gerday & G., Feller, *Xylanase Families and Extremophilic Xylanases* (FEMS Microbiol Rev. 29, 2005), h. 3.

⁸² Vielle, C and Zeikus GJ., *Hyperthermophilic Enzymes :Sources, Uses and Molecular Mechanism, for Thermostability* (Microbiol Mol Biol Rev. 65, 2001), h. 43.

yang memungkinkan membran sel berfungsi dengan baik dan stabil pada suhu tinggi.⁸³

Faktor-faktor yang dianggap berhubungan dengan termostabilitas enzim-enzim dari mikroorganisme termofilik bervariasi pada berbagai spesies termofilik, namun beberapa hal umum yang ditemukan antara lain terjadinya peningkatan ikatan hidrogen dan *salt bridge* pada protein dari enzim termofilik. Selain itu ditemukan juga adanya perbedaan jenis dan komposisi asam amino penyusun protein enzim termofil bila dibandingkan dengan protein enzim yang mesofilik. Pada enzim termofilik terjadi penurunan jumlah sistein dan serin secara nyata, sedangkan jumlah arginin dan tirosin meningkat secara nyata. Asam amino prolin juga lebih sedikit ditemukan pada struktur α -heliks pada protein termofilik⁸⁴.

Spesies termofilik paling banyak ditemukan pada kelompok bakteri dan dapat tetap hidup pada keadaan aerob, anaerob fakultatif dan anaerob. Kelompok bakteri termofil tergolong dalam kelompok Archaeobacteria yang secara umum struktur selnya memiliki beberapa kelebihan dibanding kelompok bakteri lainnya. Kelompok ini umumnya memiliki daya adaptasi yang sangat tinggi terhadap kondisi lingkungan yang bersifat ekstrim seperti temperatur, kadar garam, pH, tekanan dan oksigen dimana mikroorganisme lain tidak dapat mempertahankan aktifitas hidupnya.⁸⁵

Ada empat peristiwa yang menjadi penyebab lingkungan bersuhu tinggi yaitu sinar matahari, pembakaran, letusan gunung api, peluruhan radioaktif dan aktifitas

⁸³ Cappucino, J.G., & N. Sherman, *Microbiology: A Laboratory Manual* (San Fransisco: The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., 2002), h. 95.

⁸⁴ Kumar S., and Nussinov R., *How do Thermophilic Protein Deal with Heat? A Review*, (India: Cell. Moll. Life Sci, 2001).

⁸⁵ De Rossa M, Gambacorta A & Gliozzi A., *Structure, Biosynthesis and Physicochemical Properties of Archaeobacterial Lipids* (Microbiological Reviews. 50, 1986), h. 70.

geotermal di perut bumi. Dengan ditemukannya mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk hidup pada suhu yang relatif tinggi (60°C atau lebih) konsep tentang daya tahan dan kestabilan protoplasma sel untuk bertahan pada batas limit suhu $42^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$ perlu dipikirkan kembali. Istilah termofilik pertama kali dipergunakan oleh Miucl pada tahun 1879, untuk menggambarkan organisme yang dapat berkembang pada lingkungan dengan suhu tinggi pada saat mana bagi organisme lain sudah tidak dapat hidup⁸⁶.

Kemampuan hidup dari mikroorganisme termofil ini berhubungan dengan struktur selnya yang memiliki kelebihan dalam beberapa hal, yaitu :

a. Struktur membran sel

Membran sel setiap makhluk hidup tersusun atas senyawa lipid dan protein yang disebut lipoprotein. Pada umumnya bagian lipid dari membran sel makhluk hidup dihubungkan oleh ikatan ester, sedangkan pada organisme termofil senyawa lipid membran selnya mengandung ikatan eter yang terbentuk lewat proses kondensasi dari gliserol atau senyawa poliol kompleks lainnya dengan alkohol isoprenoid yang mengandung 20, 25 atau 40 atom karbon.⁸⁷

b. Struktur Protein

Chaperonin merupakan suatu jenis protein yang merupakan jenis protein yang tidak umum dijumpai pada protein-protein fungsional lainnya di dalam sel. Protein ini berperan dalam mempertahankan kembali struktur tiga dimensi dari protein

⁸⁶ Morrison LE and Tanner FW., *Aerobic Thermophilic Bacteria from Water in Studies on Thermophilic Bacteria*, (Journal Bacteriol, 1921), h. 343

⁸⁷ *Ibid.*

fungsional sel dari denaturasi suhu lingkungan yang bersifat ekstrim. Protein ini memiliki struktur yang tetap stabil, tahan terhadap denaturasi dan proteolisis.⁸⁸

c. Struktur DNA Gyrase

DNA gyrase merupakan salah satu anggota kelompok enzim topoisomerase yang berperan dalam mengontrol topologi DNA suatu sel dan memegang peran penting dalam proses replikasi dan transkripsi DNA.⁸⁹

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisma termofil merupakan salah satu kelompok yang menarik perhatian untuk dipelajari. Enzim dari mikroorganisme termofilik ini memiliki nilai komersial yang cukup tinggi dalam bidang industri karena memiliki daya termostabilitas yang tinggi, stabil terhadap zat-zat yang bersifat dapat mendenaturasi enzim seperti detergen dan senyawa organik lainnya, stabil dalam kondisi lingkungan yang asam maupun alkalis, sangat cocok untuk proses fermentasi di bidang industri. Kelebihan-kelebihan ini menjadikan enzim yang berasal dari mikroorganisme termofilik semakin berkembang penggunaannya dalam bidang industri dan bioteknologi. Konsep tentang termostabilitas yang dimiliki oleh enzim yang berasal dari mikroorganisme termofilik ini dilandaskan pada dua konsep yaitu pertama struktur molekular pada selnya yang memang tersusun oleh molekul protein yang termostabil, kedua termostabilitas itu berkaitan dengan adanya asosiasi senyawa protein enzim dengan molekul lainnya seperti lipid, polisakarida maupun protein lainnya yang menyebabkan terbentuknya suatu senyawa yang memiliki

⁸⁸ Kumar S & Nussinov R., *How do thermophilic protein deal with heat ? A review* (Cell. Moll. Life Sci. 58, 2001), h. 233.

⁸⁹ Maxwell A., *DNA Gyrase and the mechanism of DNA supercoiling*. (Dept. Biochemistry of Leichester, 1999).

mekanisme yang memungkinkannya tetap stabil saat menghadapi kondisi yang dapat menginaktivasinya⁹⁰.

E. Daerah Sumber Air Panas Panggo Sinjai Timur

Indonesia sebagai negara tropik mempunyai banyak daerah dengan aktivitas geotermal seperti daerah pegunungan berapi, sumber air panas dan cadangan minyak bumi dan batu bara. Beberapa kondisi lingkungan yang berbeda dalam setiap lokasi memungkinkan mengisolasi heterogenitas bakteri termofilik yang tinggi.⁹¹ Ketersediaan energi panas bumi di Indonesia secara umum berasosiasi dengan daerah magmatik dan vulkanik sebagai sumber panasnya. Kepulauan Indonesia yang berada di jalur gunung api merupakan daerah yang berpotensi bagi terbentuknya energi panas bumi.⁹²

Dalam Al-Quran surah Luqman/31: 10 Allah SWT berfirman:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ
بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۚ وَأَنزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ
زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

⁹⁰ Dessy Christina Sianturi, *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru*, (Skripsi: Universitas Sumatera Utara, 2008), h. 41.

⁹¹ Indrajaya, Madayanti F., dan Akhmaloka. *Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Termofil Isolat* (Journal Mikrobiol Indonesia, 2003), h. 53.

⁹² Andri Eko, S.W., dkk., *Survei Panas Bumi Terpadu Daerah Kampala Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan*, (proceeding pemaparan hasil kegiatan lapangan dan non lapangan pusat sumber daya geologi, 2007), h. 1

Terjemahnya : “Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (Q.S. Luqman/31: 10).⁹³

Pada ayat di atas menyebutkan bahwa Allah SWT menciptakan bumi ini dengan segala isinya. Kita sebagai hamba-Nya hendaknya senantiasa melihat tanda-tanda kekuasaan Allah Swt dengan melihat segala ciptaanya di bumi ini. Kita wajib menjaga, memelihara dan memanfaatkannya sebagai rasa syukur kita kepada Allah Swt.

Sumberdaya energy panas bumi dapat ditemukan pada air dan batuan panas di dekat permukaan bumi sampai beberapa kilometer dibawah permukaan. Bahkan jauh lebih dalam lagi sampai pada sumber panas yang ekstrim dari batuan yang mencair atau magma. Diperlukan kondisi tertentu agar supaya magma dapat berada di dekat permukaan bumi sehingga memungkinkan untuk memanaskan batuan dan air tanah di dalam reservoir, maka di permukaan bumi hanya sedikit tempat yang mempunyai potensi panas bumi. Terutama yang berada di area *Pacific Rim* atau dikenal juga sebagai *Ring of Fire* yaitu gugusan gunung berapi di kepulauan maupun pinggir benua yang membentang melingkari samudra pasifik. Panas bumi mengalir secara kontinyu dari dalam bumi menuju ke permukaan yang manifestasinya dapat berupa gunung berapi, mata air panas dan geyser.⁹⁴

⁹³ Departemen Agama R.I., *Al – Quran dan Terjemahannya*.

⁹⁴ Wahyudi Citrosiswoyo, *Geothermal dapat mengurangi kebutuhan bahan bakar fosil dalam menyediakan listrik Negara* (Jurusan Teknik Kelautan FTK-ITS, 2008), h. 1.

Di dalam kulit bumi ada kalanya aliran air dekat sekali dengan batuan panas dengan suhu bias mencapai 148° C. Air tersebut tidak menjadi uap (*Steam*) karena tidak ada kontak dengan udara. Bila air panas tadi bias keluar ke permukaan bumi melalui celah atau terjadi rekahan di kulit bumi, maka mucul air panas yang biasa disebut dengan *hot spring*. Air panas ala mini biasa dimanfaatkan sebagai kolam air panas dan banyak pula yang sekaligus menjadi tempat wisata. Mata air panas di Indonesia tak terhitung jumlahnya.⁹⁵ Sumber air panas meskipun memiliki suhu cukup tinggi ternyata dapat dijadikan untuk lingkungan tempat kehidupan bagi beberapa mikroorganisme yang tahan terhadap suhu air yang panas tersebut, seperti bakteri, fungi maupun alga yang bersifat termofilik.⁹⁶

Dalam Al Quran Surah Az-Zumar ayat 21 dijelaskan bahwa Allah Swt telah mengatur sumber-sumber air untuk dapat dimanfaatkan dalam kehidupan manusia, terutama sebagai sumber ilmu. Allah Swt berfirman:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً
فَسَلَكَهُ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا
أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهِيَجُ فَتَرَاهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ
لَذِكْرًا لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

Terjemahnya : “Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu

⁹⁵ *Ibid.*

⁹⁶ Bakrun dan Sri Widodo, *survey geolistrik di daerah panas bumi kampala Kabupaten sinjai sulawesi selatan* (Makassar: Pusat Sumber daya Geologi, 2007), h. 1.

kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal” (Q.S. Az-Zumar/39:21).⁹⁷

Kutipan ini merupakan isyarat yang diberikan Allah Swt. kepada kita hamba-Nya untuk senantiasa bersyukur atas apa yang telah diberikan Allah swt. yang telah menurunkan air dari langit dan diatur sebagai sumber-sumber air di bumi. Hendaknya ini menjadi pelajaran bagi kita hamba-Nya untuk senantiasa memanfaatkan segala yang telah diberikan Allah swt. kepada kita, salah satunya adalah sumber air panas. Allah tidak hanya sekedar memunculkan sumber air panas tersebut melainkan dengan tujuan. Kita sebagai hamba-Nya, hendaknya belajar mengembangkan ilmu pengetahuan kita agar dapat memanfaatkannya.

Daerah panas bumi Kampala yang terdapat di wilayah Kabupaten Sinjai, Sulawesi Selatan mempunyai manifestasi panas bumi berupa mata air panas Panggo dengan temperatur 62 °C. Mata air panas Panggo berada pada posisi (UTM) X = 194119 mE dan Y = 9426510 mN yang terletak di desa Kaloling. Temperatur manifestasi terukur sebesar 62 °C dengan temperatur udara 34 °C. Besar debit 1 lt/detik dengan pH terukur 8.46 dan Konduktivitas sebesar 3350 µS/cm. Kandungan kimia air panas Panggo menunjukkan tipe air Klorida.⁹⁸ Terletak di desa kaloling kec. Sinjai timur ± 8 Km dari pusat kota. Kawasan air panas panggo memiliki temperatur ± 65° C. Objek wisata ini sangat berpotensi untuk dikembangkan, karena selain memiliki areal pengembangan yang cukup luas (±2Ha) juga didukung dengan adanya aliran sungai besar yang airnya cukup jernih. Air panas Panggo muncul pada

⁹⁷ Departemen Agama R.I., *Al – Quran dan Terjemahannya* .

⁹⁸ Andri Eko, *loc.cit.*

ketinggian 12 m dpl. Kawasan ini memiliki daya tarik berupa kolam permandian, keindahan panorama perbukitan dan hutan asli serta musik tradisonal.⁹⁹

⁹⁹Administrator, “Potensi Wisata Kabupaten Sinjai,” *Situs Resmi Pemerintah Kabupaten Sinjai*. <http://www.sinjai.go.id/sinjai> (10 Oktober 2011).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif yang menggambarkan mengenai bakteri termofilik penghasil enzim selulase termostabil dari mata air panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan.

B. Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini adalah jenis bakteri termofilik penghasil enzim selulase termostabil dari sumber air panas panggo, Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan.

C. Definisi Operasional Variabel

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang mampu hidup pada lingkungan dengan suhu berkisar 45°C-100°C yang diisolasi dengan menggunakan medium Luria Bertani pada suhu 60°C. Selulase termostabil merupakan enzim yang dapat menghidrolisis selulosa yang berasal dari bakteri termofilik asal sumber air panas Panggo Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan yang memiliki ketahanan pada suhu tinggi.

D. Ruang Lingkup dan Batasan Penelitian

1. Ruang Lingkup

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari hingga Juni 2012 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin, Makassar. Sampel yang digunakan didapat dari sumber air panas panggo yang terletak di desa Kaloling Kecamatan Sinjai Timur Kabupaten Sinjai.

2. Batasan Penelitian

Sampel air panas diambil dari sumber air panas panggo, masing-masing pada 3 titik yang berbeda, titik 1 pada pusat air panas, titik 2 diambil pada mata air kecil dan titik 3 pada kolam penampungan air panas. Sampel air diambil pada permukaan air panas dan sedimen dibagian dasar sumber air panas. Sebelum mengambil sampel air, terlebih dahulu diukur suhu air di tiap titik pengambilan dengan menggunakan termometer yang dicelupkan selama 3 menit dan dilakukan pengukuran pH air di tiap titik pengambilan sampel dengan menggunakan pH meter.

Karakterisasi bakteri dilakukan pada 3 isolat dengan nilai Indeks Selulolitik (IS) terbesar. Karakter sifat bakteri termofilik yang diamati meliputi morfologi, bentuk sel dan sifat Gram.

E. Alat Penelitian

Adapun alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Mikroskop, kaca benda, penutup kaca benda, spoit, pipet mikro, ose, petri disc, batang V, labu Erlenmeyer, hotplate, magnetik stirer, neraca analitik, oven, Inkubator, batang pengaduk, jangka sorong, autoclave, LAFC, bunsen, termos, botol wrinkle.

F. Bahan Penelitian

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel air panas dari lokasi sumber air panas panggo, medium *LB*, medium *CMC*, air suling (aquadest), larutan *Congo red*, alkohol 70%, aluminium foil dan spritus,

G. Prosedur Kerja

1. Pengambilan Sampel

Sampel air dari sumber air panas panggo diambil pada 3 titik yang berbeda sebanyak 200 ml, yang terlebih dahulu telah diukur suhu dan pH air di tiap titik pengambilan sampel air. Kemudian sampel air dimasukkan kedalam botol steril yang telah disiapkan dan diberi label. Selanjutnya sampel air dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Alauddin, Makassar.

2. Sterilisasi alat dan bahan

Semua alat dan bahan yang digunakan dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan. Alat-alat yang tahan panas dibungkus dengan kertas dan disterilkan dalam oven pada suhu 160°-180°C selama 2 jam. Sedangkan medium dan alat-alat yang tidak tahan suhu tinggi disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 2 atm.

3. Isolasi Bakteri termofilik

Tahap isolasi bertujuan untuk memperoleh bakteri termofilik. Isolasi bakteri termofilik dilakukan dengan menggunakan medium Luria Bertani (LB) yang sudah disiapkan. Prosedur yang dilakukan sebagai berikut:

a. Pembuatan medium Luria Bertani (LB)

Semua bahan (Ekstrak yeast 5 g, pepton 5 g, NaCl 5 g, bacto agar 5 g) dimasukkan kedalam gelas piala lalu ditambahkan 1 liter aquades. Selanjutnya dididihkan dengan mengguakan hot plate dan magnetic stirrer sampai semua bahan larut. Kemudian pH diatur menjadi 7 dengan menambahkan HCl atau NaOH 1N lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Medium yang telah disterilkan di tuang ke cawan petri masing-masing 20 ml. Cawan petri berisi medium dan medium yang tersisa disimpan dalam lemari pendingin sampai akan digunakan.

b. Persiapan Sampel

Sampel air panas diambil sebanyak 0,1 ml kemudian disebar ke medium LB padat lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 48 jam. Tiap sampel air panas dibuat ulangannya 2 kali.

c. Pemurnian Isolat

Bakteri yang tumbuh dan berkembang biak dengan baik pada medium LB selanjutnya dimurnikan pada medium agar. Tujuan pemurnian adalah untuk memisahkan bakteri agar diperoleh jenis atau strain bakteri yang tidak bercampur dengan jenis/stain lain. Pemurnian dilakukan dengan cara menganbil 1 ose koloni bakteri yang terpisah dan digores pada medium LB yang baru kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 24 jam. Dari koloni yang tumbuh dilakukan penggoresan kembali pada medium LB untuk mendapatkan isolat yang benar-benar murni. Isolat yang telah murni disimpan dalam medium agar miring penyimpanan pada suhu 4°C.

4. Seleksi Bakteri Termofilik Penghasil Selulase

a. Pembuatan Medium *CMC* : semua bahan (1 Gram K_2HPO_4 , 0,5 Gram $MgSO_4$, 1 Gram *CMC*, 5 Gram bacto agar, 1 Gram KCL, 1 Gram $NaNO_3$, 0,5 Gram ekstrak yeast dimasukkan ke dalam gelas piala lalu ditambah 1 L aquadest, kemudian pH medium diatur menjadi 7 dengan penambahan HCl 1 N atau NaOH 1 N. Selanjutnya dididihkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* sampai semua bahan larut, lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan disterilkan dengan otoklaf pada suhu $115^{\circ}C$ selama 15 menit pada tekanan 2 atm. Medium yang telah disterilkan di tuang ke cawan petri masing-masing 20 ml dan medium yang tersisa disimpan dalam lemari pendingin sampai akan digunakan.

b. Aktivitas selulase

Masing-masing isolat murni ditotol secara serentak pada medium *CMC* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu $60^{\circ}C$. Bakteri yang menunjukkan aktivitas selulase memperlihatkan zona bening di sekitar koloni setelah ditetesi 0,1% larutan *Congo red*. Terbentuknya zona bening disekeliling koloni menunjukkan adanya isolat bakteri yang mampu menghasilkan selulase.

5. Karakteristik morfologi bakteri termofilik

Isolat yang memiliki nilai aktivitas yang tinggi dikarakterisasi sifat morfologi mencakup bentuk sel dan sifat Gram.

Pewarnaan Gram : Gelas obyek dibersihkan dengan alkohol kemudian difiksasi di atas lampu spiritus, selanjutnya isolat aktif diambil secara aseptik dan diletakkan di atas permukaan gelas objek lalu diratakan, difiksasi kembali

di atas lampu spirtus. Setelah dingin, ditetaskan larutan Gram A (kristal violet) 2 – 3 tetes selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Selanjutnya, ditetesi dengan Gram B (Iodium) selama 1 menit, cuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Kemudian ditetesi dengan Gram C (Alkohol 96%) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Terakhir ditetesi dengan larutan Gram D (Safranin) selama 45 detik, lalu dicuci dengan air mengalir. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran tertentu untuk melihat bentuk dan warna sel.

H. Analisis Data

Data berupa morfologi dipaparkan secara *deskriptif*.

BAB IV

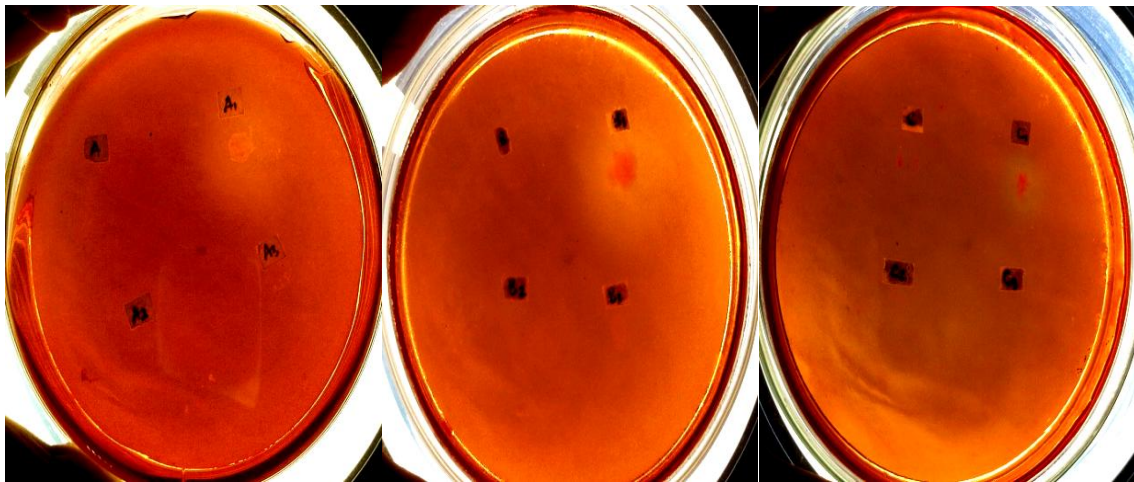
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Isolasi dan Seleksi Selulolitik Termofilik

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan enam isolat bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas Panggo, Kabupaten Sinjai. Masing-masing dari Titik 1 (suhu 60°C, pH 7), Titik 2 (suhu 61°C, pH 7) dan Titik 3 (suhu 57°C, pH 7) (Lampiran 1). Seluruh tahap inkubasi pada proses isolasi dan seleksi dilakukan pada suhu 60°C hal ini dimaksudkan agar bakteri selulolitik yang terseleksi merupakan bakteri selulolitik yang memiliki aktivitas optimum dan stabilitas pada suhu tinggi.

Isolat yang mampu menghidrolisis selulosa ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni. Dari hasil uji aktivitas selulolitik secara kualitatif diperoleh tiga isolat yang menunjukkan zona bening terbesar, yaitu A1 dengan nilai aktivitas kualitatif 2,13 yang diperoleh dari titik 2, B1 dengan nilai aktivitas kualitatif 2,83 yang diperoleh dari titik 2 dan C1 dengan nilai aktivitas kualitatif 2,06 yang diperoleh dari titik 1. Ketiga isolat dengan zona bening terbesar dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan Tabel 4.1.



Gambar 4.1. Hasil Seleksi Bakteri pada Medium CMC setelah diinkubasi pada suhu 60°C selama 24 jam

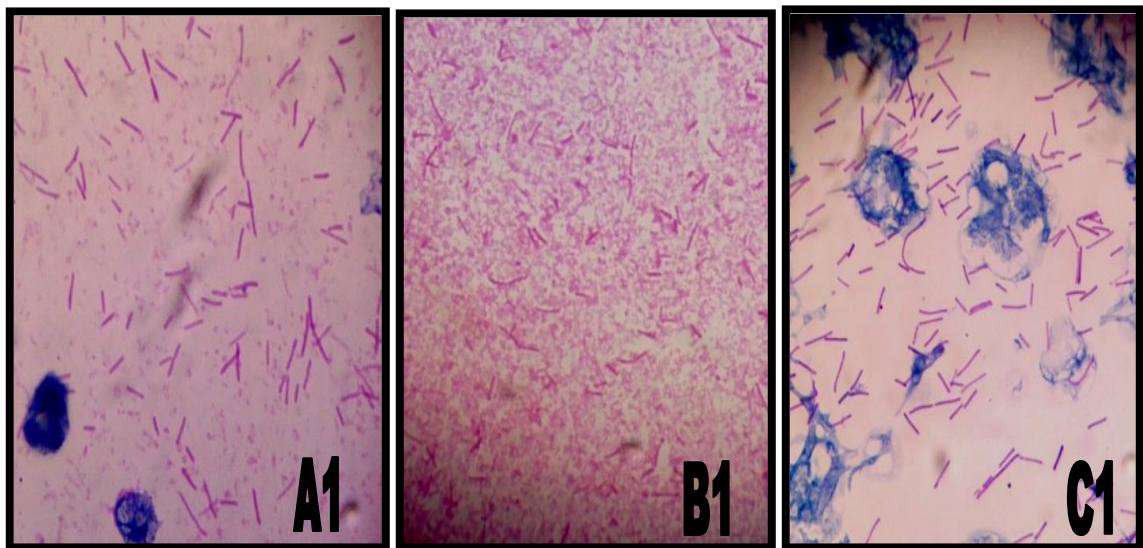
Koloni bakteri yang memperlihatkan zona bening kemudian diukur Indeks selulolitiknya yaitu nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Semakin tinggi nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri menunjukkan semakin tinggi aktivitas spesifik enzim selulasenya. Hasil hidrolisis ketiga isolat dengan zona bening terbesar dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Kemampuan Aktivitas Selulolitik Bakteri Termofilik

Kode Isolat Bakteri	Diameter Zona Bening (mm)	Diameter Koloni Bakteri (mm)	Indeks Selulolitik (mm)
A1	12,25	5,75	2,13
B1	4,25	1,5	2,83
C1	16,5	8	2,06

2. Karakterisasi Morfologi Bakteri Selulolitik

Karakterisasi morfologi isolat bakteri dilakukan berdasarkan pengamatan makroskopis koloni dan mikroskopis sel. Pengamatan makroskopis koloni yang dilakukan meliputi bentuk, warna, elevasi, tepi dan permukaan koloni. Koloni yang tumbuh diatas lempengan agar, perlu diperhatikan warna, sifat tembus cahaya, pinggiran (tepi), sifat permukaan (elevasi), dan bentuknya. Hal ini dimungkinkan diperoleh ciri-ciri morfologi koloni bakteri.¹⁰⁰ Tahap penting yang juga harus dilakukan dalam karakterisasi bakteri adalah proses pewarnaan Gram yang merupakan pewarnaan diferensial. Bakteri Gram positif pada pewarnaan Gram akan berwarna ungu sedangkan bakteri Gram negatif pada pewarnaan Gram akan berwarna merah. Dari hasil pewarnaan Gram menunjukkan ketiga isolat bersifat Gram positif. Gambar hasil pewarnaan isolat bakteri dapat dilihat pada Gambar 4.2.



¹⁰⁰ Lay, B.W., *Analisa Mikroba diLaboratorium* (Cet. I; Jakarta; PT. Raja Grafindo Persada, 1994), h. 99.

Gambar 4.2. Hasil Pengamatan Mikroskopis Pengecatan Gram di bawah Mikroskop Perbesaran 40 x 100

Ketiga isolat yang terpilih, secara makroskopis memiliki karakteristik koloni yang tidak jauh berbeda pada medium agar CMC. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Karakteristik Morfologi Koloni Bakteri Selulolitik

Isolat	Morfologi Koloni					Morfologi Bakteri			
	Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi	Permukaan	Bentuk	Penataan	Warna	Gram
A1	Krem	Bulat	Rata	Convex	Halus Mengkilap	<i>Bacil</i>	mono, diplo	Ungu	+
B1	Krem	Bulat	Rata	Convex	Halus Mengkilap	<i>Bacil</i>	mono, diplo	Ungu	+
C1	Putih	Bulat	Rata	Convex	Kasar	<i>Bacil</i>	mono, diplo	Ungu	+

Hasil pengamatan morfologi koloni menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki bentuk bulat, tepi rata dan elevasi cembung. Perbedaan ditemukan pada permukaan dan warna koloni. Permukaan pada isolat A1 dan B1 halus mengkilap dan C1 kasar. Warna koloni A1 dan B1 krem sedangkan koloni C1 Putih. Hasil pengamatan morfologi bakteri setelah pewarnaan menunjukkan ketiga isolat berbentuk mono basil dan diplo basil. Pewarnaan Gram menunjukkan ketiga isolat bersifat Gram positif.

B. Pembahasan

1. Isolasi dan Seleksi Bakteri Termofilik Selulolitik

Sampel air pada penelitian ini diperoleh dari sumber air panas Panggo Kecamatan Sinjai Timur, Kabupaten Sinjai. Sumber air panas ini memiliki potensi

besar sebagai objek penelitian karena merupakan sumber air yang belum tercemar sehingga biotanya masih terjaga. Selain itu, sumber air panas ini diharapkan dapat menghasilkan bakteri lokal yang dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri. Sampel air panas diambil dari tiga titik dengan tujuan agar bakteri yang diisolasi bisa lebih beragam. Sampel air panas diambil menggunakan botol steril dan langsung dibawa ke laboratorium untuk diteliti agar bakteri yang terdapat pada air tersebut tidak mati. Pengambilan sampel dilakukan pada bagian permukaan dan bagian sedimen yang terletak didasar sumber air panas. Pengambilan pada bagian sedimen dilakukan karena sedimen merupakan habitat yang kompleks bagi mikroorganisme.

Sampel air kemudian diisolasi dengan pH 7,0 (sesuai dengan pH pada lokasi sumber air panas Panggo) pada medium *Luria bertani* dengan metode sebar. Isolat yang tumbuh kemudian dimurnikan untuk memisahkan bakteri agar diperoleh jenis bakteri yang tidak bercampur dengan jenis bakteri lain.

Media seleksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah CMC (*Carboxyl Methyl Cellulase*). Senyawa CMC merupakan turunan selulosa yang mudah larut dalam air. Isolat-isolat yang memiliki aktivitas selulolitik akan mampu menghidrolisis CMC setelah ditetesi *Congo red* 0,1%. Bagian yang terhidrolisis akan membentuk zona bening sedangkan bagian yang tidak terhidrolisis akan berwarna gelap.

Dari hasil seleksi yang telah dilakukan pada medium CMC diperoleh 6 isolat bakteri selulolitik termofilik (Lampiran 1). Kemampuan selulolitik

ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni setelah ditetesi *Congo red* 0,1%. *Congo red* memiliki interaksi kuat dengan polisakarida yang mengandung unit-unit β -D-glukan seperti selulosa. Kemampuan interaksi ini dapat dijadikan indikator hidrolisis selulosa dalam media agar CMC yang ditunjukkan oleh adanya zona bening disekitar koloni bakteri selulolitik setelah ditetesi *Congo red*. Adanya zona bening disebabkan oleh enzim selulase yang dikeluarkan ke dalam medium merupakan metabolit yang tidak berwarna. Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan bakteri selulolitik yang berperan penting dalam menghidrolisis selulosa. Enzim ekstraseluler adalah enzim yang dihasilkan didalam sel, tetapi dikeluarkan ke dalam medium tumbuhnya.¹⁰¹ Bakteri menghasilkan enzim ekstraseluler untuk menghidrolisis sumber makanan yang mengandung selulosa yang terdapat dalam medium. Molekul selulosa tidak dapat masuk kedalam sel bakteri karena ukurannya sangat besar, karena itu molekul selulosa dihidrolisis terlebih dahulu oleh enzim selulase menjadi molekul selobiosa yang lebih sederhana. Molekul ini selanjutnya akan ditransport masuk ke dalam sel bakteri dan digunakan sebagai sumber karbon bagi aktivitas pertumbuhannya.

Carboxymethylcellulose (CMC) adalah salah satu bahan tambahan makanan berupa bahan penstabil yang berfungsi sebagai pengikat air dan pembentuk gel. CMC dapat membentuk sistem dispersi koloid dan meningkatkan viskositas sehingga partikel-partikel yang tersuspensi akan tertangkap dalam

¹⁰¹ Wijaya, S. *Isolasi Selulase dari Sclerodema columnare dan Thricoderma harzianum*, J.

sistem tersebut dan tidak mengendap. CMC dapat mencegah pengendapan protein pada titik isoelektrik dan meningkatkan kekentalan, disebabkan bergabungnya gugus karboksil CMC dengan gugus muatan positif dari protein. Senyawa CMC merupakan turunan selulosa yang mudah larut dalam air. Bakteri dapat tumbuh dengan selulosa sebagai sumber karbon. Oleh karena itu penggunaan CMC sangat tepat sebagai substrat bagi sintesis enzim selulase.

Pembentukan zona bening pada medium CMC menunjukkan bahwa selulosa yang terdapat di dalam media dihidrolisis oleh enzim selulase menjadi senyawa yang sederhana yaitu selobiosa yang kemudian disederhanakan menjadi dua molekul glukosa. Besarnya nisbah antara diameter zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri menunjukkan besarnya kemampuan selulase ekstraseluler yang dihasilkannya.

Jumlah populasi bakteri dan luasan zona bening secara tidak langsung dipengaruhi oleh media tumbuh. Media tumbuh yang sesuai dengan kondisi dan kebutuhan nutrisi bakteri akan menyebabkan bakteri tersebut tumbuh dengan optimal.¹⁰² Pemberian nutrisi yang cukup akan membantu proses perkembangan, bakteri yang mendapatkan kecukupan nilai nutrisi akan berkembang menjadi banyak dengan laju semakin cepat. Perkembangan yang cepat ini akan berdampak pada kepadatan populasi.

¹⁰² Pelczar, M.J and E.C.S. Chan. *Dasar-dasar Mikrobiologi II. Terjemahan : Hadioetomo, R.S.,T. Imas, S.S.Tjitrosomo & S.L. Angka* (Jakarta: Universitas Indonesia (UI)-Press. 1986), h. 62.

Semakin banyak populasi bakteri yang tumbuh, maka semakin banyak pula enzim yang disekresikan. Demikian juga sekresi enzim juga dipengaruhi oleh zat nutrisi yang masuk dalam tubuh bakteri. Jika bakteri mendapatkan kecukupan zat nutrisi yang dibutuhkan, maka proses metabolisme dalam tubuhnya akan berjalan dengan lancar. Enzim yang disekresikan ini akan dimanfaatkan untuk menghidrolis zat makanan yang masih berbentuk struktur kompleks untuk disederhanakan menjadi bentuk monomer sederhana sehingga dapat dimanfaatkan oleh tubuhnya.

Sekresi enzim selulase oleh mikroba dimanfaatkan untuk mengubah selulosa menjadi selubiosa. Kandungan selubiosa yang terdapat dalam media tumbuh hasil hidrolisis dari selulosa akan dimanfaatkan oleh mikroba itu sendiri sebagai zat makanan. Tingginya kandungan selubiosa dalam media akan memberikan kecukupan nutrisi pada mikroba sehingga dapat berkembang dengan baik yang ditandai dengan meningkatnya populasi mikroba dan terbentuknya zona bening yang lebar.

Dari hasil uji aktivitas selulolitik secara kualitatif diperoleh tiga isolat yang menunjukkan zona bening terbesar, yaitu A1 dengan nilai aktivitas 2,13, B1 dengan nilai aktivitas 2,83 dan C1 dengan nilai aktivitas 2,06 (Tabel 2.1.). Besar kecilnya zona bening ini sangat tergantung pada kemampuan bakteri untuk memproduksi selulase sangat bervariasi. Perbedaan tersebut mungkin disebabkan

perbedaan kecil pada gen yang mengkodonya.¹⁰³ Lingkungan dengan derajat keasaman, komposisi gas dan mineral, serta nutrisi yang bervariasi juga dapat menyebabkan adanya keanekaragaman genetik dan metabolisme bakteri. Isolat A1 dan B1 diperoleh dari sumber air panas pada titik 2 dengan pH 7 dan suhu air 60°C, Isolat C1 diperoleh dari titik 1 dengan pH 7 dan suhu air 61°C Adanya Variasi diameter zona bening yang ditemukan pada tiap isolat diduga disebabkan karena adanya perbedaan suhu baik pada kondisi alami maupun perlakuan selama di laboratorium. Dimana, Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu, pH, konsentrasi substrat dan enzim, suhu dan adanya aktivator atau inhibitor.¹⁰⁴

2. Karakterisasi Morfologi Bakteri Selulolitik

Karakterisasi morfologi isolat bakteri dilakukan berdasarkan pengamatan makroskopis koloni dan mikroskopis sel. Pengamatan makroskopis koloni yang dilakukan meliputi bentuk, warna, elevasi, tepi dan permukaan koloni. Hasil pengamatan morfologi koloni menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki bentuk bulat, tepi rata dan elevasi cembung (Tabel 4.2.). Perbedaan ditemukan pada permukaan dan warna koloni. Permukaan pada isolat A1 dan B1 halus mengkilap dan C1 kasar. Warna koloni A1 dan B1 krem sedangkan koloni C1 Putih. Warna

¹⁰³ Tronsmo, A & Harman, G.E., *Detection & Quantification of N-acetyl-Beta-D Glucosaminidase, Chitobiosidase & Endochitinase in Solations & On Gels Anal.* (Anal Biochem: 208, 1993), h. 74.

¹⁰⁴ Lehninger, A.L., *Dasar-dasar Biokimia* (Cet. I; Jakarta: Erlangga, 1997), h. 99.

koloni yang berbeda berhubungan dengan permukaan luar bakteri dan selaput yang menyelimuti bakteri (selimut). Selimut bukan suatu bagian yang sangat vital bagi bakteri, akan tetapi selimut dapat menentukan kelompok utama bakteri. Sekelompok bakteri yang bergerombol akan memberikan pola dan warna sesuai dengan ciri khas masing–masing spesies.¹⁰⁵

Selain pengamatan morfologi koloni bakteri diamati pula bentuk sel dan jenis Gram dari isolat bakteri selulolitik. Pengamatan secara mikroskopis yaitu dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan ini dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang diperoleh agar dapat diklasifikasikan sebagai bakteri Gram positif atau Gram negatif. Pengamatan secara mikroskopis terhadap bakteri Gram positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada sel bakteri. Hal tersebut disebabkan karena bakteri Gram positif mempunyai kandungan lipid yang lebih rendah, sehingga dinding sel bakteri akan lebih mudah terdehidrasi akibat perlakuan dengan alkohol. Dinding sel yang terdehidrasi menyebabkan ukuran pori-pori sel menjadi kecil dan daya permeabilitas berkurang sehingga zat warna kristal violet yang merupakan zat utama tidak dapat keluar dari sel dan sel akan tetap berwarna ungu.¹⁰⁶

¹⁰⁵ Pelczar, M.J and E.C.S. Chan. *loc. cit.*

¹⁰⁶ Cappucino, J.G., & N. Sherman, *Microbiology: A Laboratory Manual* (San Fransisco: The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., 2002), h. 95.

Dinding sel bakteri mengandung komponen utama berupa asam tekoat, protein, polisakarida, lipoprotein, dan lipopolisakarida yang terikat pada peptidoglikan. Peptidoglikan ini mempunyai peran penting dalam pewarnaan Gram. Warna ungu yang tampak pada saat pewarnaan Gram berasal dari permukaan dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel berkomposisi peptidoglikan yang membentuk persenyawaan kompleks kristal violet-yodium ribonukleat dan tidak larut dalam aceton alkohol.¹⁰⁷

Sedangkan bakteri Gram negatif akan memberikan warna merah pada saat pewarnaan Gram. Bakteri Gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak (lipopolisakarida) dengan persentase lebih tinggi daripada yang terkandung dalam bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis daripada dinding sel bakteri Gram positif.¹⁰⁸

Pengamatan morfologi isolat A1, B1 dan C1 menunjukkan ciri morfologi yang mengarah ke genus *Bacillus* yang memiliki ciri-ciri, yaitu merupakan bakteri Gram positif, mempunyai morfologi sel yang berbentuk batang, tumbuh pada medium yang mengandung oksigen (bersifat aerobik) pada suhu diatas 45°C, koloni berbentuk bulat dan berukuran sedang. Ketiga isolat mampu menghidrolisis selulosa dan pati yaitu mampu menghasilkan enzim selulase dan enzim amilase mendekati ciri dari *Bacillus stearothermophilus* dan *Bacillus circulans*. Berdasarkan *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*

¹⁰⁷ Lay. B.W., *loc. cit.*

¹⁰⁸ Pelczar, M.J and E.C.S. Chan. *loc. cit.*

Third Edition, beberapa genus *Bacillus* memiliki kemampuan menghidrolisis CMC serta selobiosa yang merupakan senyawa turunan dari selulosa. Beberapa jenis bakteri yang mampu menghidrolisis selulosa lain berbentuk *bacil* adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, dan *Bacillus licheniformis*. Jenis mikroorganisme termofilik penghasil selulase yang telah ditemukan sebelumnya yakni *Geobacillus* pada perairan hydrothermal vent yang tumbuh optimum pada suhu 65°C.¹⁰⁹

Bacillus merupakan salah satu kelompok bakteri gram positif. Anggota genus ini dapat membentuk endospora yang dibentuk secara intraseluler sebagai respon terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, oleh karena itu anggota genus *Bacillus* memiliki toleransi yang tinggi terhadap kondisi lingkungan yang berubah-ubah. Anggota genus ini tergolong bakteri termofilik karena tidak hanya tahan terhadap pemanasan pada suhu yang relatif tinggi, *Bacillus* juga membutuhkan suhu tinggi untuk pertumbuhannya.

Enzim selulolitik dari bakteri termofilik diharapkan dapat diaplikasikan pada berbagai industri yang membutuhkan temperatur tinggi dalam prosesnya. Karena itu, pencarian bakteri termofilik penghasil enzim selulase yang tahan terhadap panas merupakan salah satu usaha yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi dan menarik untuk diterapkan dalam industri bioteknologi. Enzim selulolitik yang dihasilkan dapat dimanfaatkan dalam industri makanan dan pemanis,

¹⁰⁹ Nurul Fitri Sari, *Karakterisasi Bakteri Selulase Termofilik Asal Perairan Kawasan Hydrothermal Vent Kepulauan Kawio, Sulawesi Utara* (Bandung: Sekolah Ilmu Teknologi Hayati-ITB, 2012), h. 2.

menjernihkan dan mengekstrak jus buah, memperbaiki kualitas nutrisi pakan kuda atau sapi, serta digunakan dalam pengolahan limbah industri.¹¹⁰

¹¹⁰ Jang HD, Chang KS. *Thermostable cellulase from Streptomyces sp. : scale up production in a fermenter. Biotechnol Letters* 27, 2005), h. 239.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tentang Skrining bakteri termofilik penghasil enzim selulase dari sumber air panas Panggo, Kab. Sinjai Sulawesi Selatan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Sumber Air panas Panggo, Kab. Sinjai Sulawesi Selatan memiliki isolat bakteri termofilik dan 6 isolat bakteri mampu menghasilkan enzim selulase dengan menghidrolisis selulosa pada medium CMC. Aktivitas selulolitik isolat bakteri yaitu nisbah antara diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. IS masing – masing isolat adalah isolat A1= 2,13, B1= 2,83 dan C1= 2,06.
2. Bakteri selulolitik yang terdapat pada mata air panas Panggo, Kab. Sinjai Sulawesi Selatan merupakan bakteri Gram Positif berbentuk Basil dengan penataan monobasil dan diplobasil. Karakter koloni isolat A1 dan B1, yaitu berwarna krem, bentuk bulat, tepi rata, elevasi cembung dan permukaan halus mengkilap. Sedangkan isolat C1 berwarna putih, bentuk bulat, tepi rata, elevasi cembung dan permukaan koloni kasar.

B. *Saran*

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi jenis bakteri penghasil enzim selulase termostabil dan pengujian aktivitas enzim ini ke tingkat yang lebih murni sehingga potensi enzim selulase dari isolat sumber air panas Panggo dapat diketahui kemampuannya untuk digunakan pada berbagai aplikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Administrator, *Potensi Wisata Kabupaten Sinjai. Situs Resmi Pemerintah Kabupaten Sinjai*. <http://www.sinjai.go.id/sinjai>. 11 Oktober 2011.
- A, Girindra. *Biokimia I*. Cet. III; Jakarta: Gramedia, 1993.
- Aguilar, A. *Extremophile Research in the European Union: From Fundamental Aspects to Industrial Expectations*. FEMS Microbiol, 1996.
- Aguskrisno, *Kajian Mikrobiologi Industri. Blog Aguskrisno: Pondok Ilmu*. <http://Pondok-lmu-Kajian-Mikrobiologi-Industri.Wordpress.com>. 15 Oktober 2011.
- A. L, Lehninger. *Dasar-dasar Biokimia*. Cet. I; Jakarta: Erlangga, 1998.
- Annisa, Y. *Studi Penentuan Aktivitas Enzim Lipase dari Bakteri Proteus vulgaris Galur local PP-1 dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis dan metode Titrimetri*. BandarLampung: FMIPA Universitas Lampung, 2006.
- A, Poedjadi A. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- A, Rachman. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Bogor: Depdikbud, Institut Pertanian Bogor, 1989.
- Ariningsih, Masanori Sari, *Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik Dan Penentuan Kondisi Optimum Enzim Selulase Isolat C2cii Rp*. Repository Universitas Andalas. <http://repository.unand.ac.id>. 16 Juli 2012.
- A, Tronsmo & Harman, G.E., *Detection & Quantification of N-acetyl-Beta-D Glucosaminidase, Chitobiosidase & Endochitinase in Solations & On Gels Anal*. Anal Biochem : 208, 1993.
- Aunstrup, K. *Production isolation and economic of extracellular enzymes*. New York: Applied biochemistry bioengginering enzymes technology, Academic Press, 1979.
- Bauman, R.W., *Microbiology*. Toronto: Benjamins Cummings, 2004.
- Brock, T.D., M.T. Madigan., J.M., Martinko & J. Parker, *Biology of Microorganism*. New Jersey : Prentice Hall, Inc., 1994.
- Cappucino, J.G., & N. Sherman, *Microbiology: A Laboratory Manual*. San Fransisco: The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., 2002.
- Citrosiswoyo, Wahyudi. *Geothermal dapat mengurangi kebutuhan bahan bakar fosil dalam menyediakan listrik Negara*. Jurusan Teknik Kelautan FTK-ITS, 2008.
- Collins, T.C., Gerday & G., Feller, *Xylanase Families and Extremophilic Xylanases*. FEMS Microbiol Rev. 29, 2005.
- Darwis, A.A & Sunarti, T.C., *Teknologi Mikrobial*. Institut Pertanian Bogor, 1992.
- Departemen Agama R.I., *Al – Quran dan Terjemahannya*.

- De Rossa M, Gambacorta A & Gliozzi A., *Structure, Biosynthesis and Physicochemical Properties of Archaeobacterial Lipids*. Microbiological Reviews. 50, 1986.
- E, Baldwin. *Dynamic Aspects of Biochemistry*. Cambridge: University Press, 1973.
- Edward, C., *Thermophiles, Microbiology of Extreme Environments*. Alden Press, Oxford, 1990.
- Eko, Andri, S.W., dkk., *Survei Panas Bumi Terpadu Daerah Kampala Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan. Proceeding pemaparan hasil kegiatan lapangan dan non lapangan pusat sumber daya geologi*, 2007.
- Enari, T.M., *Microbial Cellulases*. New York: Microbial Enzymes and Biotechnology. App.Sci. Publ., 1983.
- Fanani, M. Z. ***Eksplorasi Novel Gen Glikosida Hidrolase untuk Degradasi Biomassa: Pendekatan secara Metagenomik***. <http://Eksplorasi-Gen-Glikosida-Hidrolase.wordpress.com> . 16 Juli 2012.
- Flickinger, M.C. dan Stephen W.D. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999.
- George, G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, USA: Springer-verling, 2001.
- Indrajaya, Madayanti F., dan Akhmaloka. *Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Termofil Isolat*. Journal Mikrobiol Indonesia, 2003.
- KF, Hartati KF, dkk. *Faktor-faktor yang Berpengaruh Terhadap Tahap Deproteinase Menggunakan Enzim Protease Dalam Pembuatan Kitin dari Cangkang Rajungan*. Biosains, 2002.
- Kim, H. *Characterization and Substrate Specivicity of an Endo Betha 1,4 DGlukanase (Avicelase I) from An Extracellular Multienzyme Complex of Bacillus Circulans*. Appl Environ Microbiol 61, 1995.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., dan Singh, A. *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications*. Pakistan : Review Article of Enzyme Research, 2011.
- Kulp, K. *Carbohydrases. Dalam G.Reed (ed) Enzyme and food processing*. New York: Academic Press, 1975.
- Kumar S & Nussinov R., *How do thermophilic protein deal with heat ? A review*. Cell. Moll. Life Sci. 58, 2001.
- Lay, B.W., *Analisa Mikroba diLaboratorium*. Cet. I; Jakarta; PT. Raja Grafindo Persada, 1994.
- Lestari. *Eksplorasi Enzim Termotabil dari Mikroorganisme Termofil*. Purwokerto: Fakultas Biologi, Univ. Jendral Sudirman, 2000.
- Palmer T., *Understanding Enzyme*. Ellishorwood publisher, 1985.
- Prescott. S. C. and C. G. Duns., *Industrial Microbiology*. AVI Pub Co. Inc. Eastport, Connecticut, 1981.

- Poedjiadi, Anna dan F.M., Titin Supriyanti, *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta; Penerbit Universitas Indonesia, 1994.
- Poernomo, *Kitinase Dalam Pengendalian Hayati*. Jakarta: Majalah Farmasi Airangga, 2004.
- R, Jenni, *Program Enzim Selulase-Hemiselulase pada Proses Drinking Kertas Koran Bekas*. Jurnal Matematika dan Sains, 2003.
- RK, Murray, Granner, D.K., Rodwell, V.W., *Biokimia*. Jakarta: EGC, 2003.
- Sumardjo, Damin. *Pengantar Kimia*. Cet. I; Jakarta: EGC, 2008.
- RM., Maier, Pepper IL & Gerba CP., *Enviromental Microbiology*. London: Academic Press, 2000.
- Sajidan, Teknologi Rekombinan Enzim Fitase Dan Implementasinya Dalam Pembelajaran Mata Kuliah Biokimia, Genetika Dan Bioteknologi. *Blog Perpustakaan Universitas Sebelas Maret*. <http://UPT-Perpustakaan-universitas-sebelas-maret.pustakauns.ac.id>. 20 Oktober 2011.
- Sari, Nurul Fitri, *Karakterisasi Bakteri Selulase Termofilik Asal Perairan Kawasan Hydrothermal Vent Kepulauan Kawio, Sulawesi Utara*. Bandung: Sekolah Ilmu Teknologi Hayati- ITB, 2012.
- Shahib MN., *Pemahaman Seluk Beluk Biokimia dan Penerapan Enzim*. Citra Aditya Bakti, 1992.
- S. Muchtad, Nurleni dan Made. *Enzim dalam Industri Pangan*. Bandung: Institut Pertanian Bogor, 1992.
- Soeprijanto dkk., *Biokonversi Selulose dari Limbah Tongkol Jagung Menjadi Glukosa Menggunakan Jamur Aspergillus Niger*. Surabaya: Fakultas Teknologi Industri, Institut teknologi Sepuluh Nopember, 2008.
- Suhartono, M.T., *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Depdikbud, Institut Pertanian Bogor, 1989.
- Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., dan Pandey, A. 2005. *Microbial Cellulases-Production, Applications, and Challenges*. Journal of Scientific & Industrial Research Vol 65, November 2005.
- S, Wijaya. *Isolasi Selulase dari Sclerodema columnare dan Thricoderma harzianum, J. Ilmu Dasar*. Kalimantan: Fakultas MIPA Univ. Jember, 2002.
- Td, Brock & Brock KM. *Basic Microbiology With Application*. Cet. II; Prentice Hall, Inc, New Jersey, 1978.
- Tika, I Nyoman, dkk. *Isolasi Enzim Lipase Termostabil Dari Bakteri Termofilik Isolat Air Panas Banyuwedang Kecamatan Gerogak, Buleleng Bali*. Bali: IKIP Negeri Singaraja, 2007.
- T, Palmer, *Understanding Enzyme*. Ellishorwood publisher, 1985.
- Vielle, C dan Zeikus, GJ. *Hyperthermophilic enzyymes: Sources, Uses and Molecular Mechanism, for Thermostability*. Microbiol Mol Biol Rev. 65, 2001.

Weng, Antony. *Produksi Enzim Selulase*. Blog Antony Weng. <http://produksi-enzim-selulase.wordpress.com>.

Wirahadikusumah, M. *Teknologi Enzim*. Bandung: Bioteknologi ITB, 1990.